

**EFEITO ANTIMICROBIANO DO EXTRATO ETANÓLICO DE
SOLANUM PALINACANTHUM E *SIPARUNA GUIANENSIS* EM
ESCHERICHIA COLI MULTIRRESISTENTES ISOLADAS DE
ALIMENTOS**

JATAÍ -GO

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Jataí (UFJ) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFJ), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data. O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFJ é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☒ [X] Dissertação ☐ [] Tese

2. Nome completo do autora: LARISSA ALVES OLIVEIRA

3. Título do trabalho: EFEITO ANTIMICROBIANO DO EXTRATO ETANÓLICO DE SOLANUM PALINACANTHUM E SIPARUNA GUIANENSIS EM ESCHERICHIA COLI MULTIRRESISTENTES ISOLADAS DE ALIMENTOS

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento ☒ [x] SIM ☐ [] NÃO

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

https://sei.ufg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=2800027&infra_sistema=1... 1/2

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Cecília Nunes Moreira, Professora do Magistério Superior**, em 18/10/2021, às 10:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **LARISSA ALVES OLIVEIRA, Discente**, em 18/10/2021, às 21:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2401961** e o código CRC **01413ACF**.

LARISSA ALVES OLIVEIRA

**EFEITO ANTIMICROBIANO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *SOLANUM
PALINACANTHUM* E *SIPARUNA GUIANENSIS* EM *ESCHERICHIA COLI*
MULTIRRESISTENTES ISOLADAS DE ALIMENTOS**

Discente: Larissa Alves Oliveira

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cecília Nunes
Moreira. Dissertação apresentada ao
Programa de Biociência Animal da
Universidade Federal de Jataí, como pré
requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Biociência Animal

JATAÍ -GO

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFJ.

Oliveira, Larissa Alves

EFEITO ANTIMICROBIANO DO EXTRATO ETANÓLICO DE SOLANUM PALINACANTHUM E SIPARUNA GUIANENSIS EM ESCHERICHIA COLI MULTIRRESISTENTES ISOLADAS DE ALIMENTOS / Larissa Alves Oliveira, Cecilia Moreira Nunes. - 2021. 3, 57 f.

Orientador: Prof. Cecilia Moreira Nunes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Jataí, Unidade Acadêmica Especial de Ciências Agrárias, Jataí, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Jataí, 2021.

1. enterobactérias. 2. DEC. 3. multirresistência a antimicrobianos. 4. saúde pública. 5. Plantas medicinais. I. Nunes, Cecilia Moreira. II. Nunes, Cecilia Moreira, orient. III. Título.

CDU 639.09



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **020/2021-PPGBA** da sessão de Defesa de Dissertação de **LARISSA ALVES OLIVEIRA**, que confere o título de Mestra no Programa de Pós-Graduação em **BIOCIÊNCIA ANIMAL**, área de concentração em Saúde e Produção Animal.

Ao trigésimo dia, do mês de setembro do ano de dois mil e vinte e um, a partir das 08:30 horas, realizou-se por meio de videoconferência a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada "EFEITO ANTIMICROBIANO DO EXTRATO DE SOLANUM PALINACANTHUM E SIPARUNA GUIANENSIS EM ESCHERICHIA COLI E SALMONELLA SPP. ISOLADAS DE ALIMENTOS". Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Professora Doutora Cecília Nunes Moreira (UACIAGRA/UFJ - Universidade Federal de Jataí/GO) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor Ariel Eurides Stella (UACIAGRA/UFJ - Universidade Federal de Jataí/GO) membro interno e Doutor Edismauro Garcia Freitas Filho (FMRP/USP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Biologia Celular e Molecular) - membro externo. Durante a arguição os membros da banca **fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora se reuniu em sessão secreta, a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora Cecília Nunes Moreira, Presidenta da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao trigésimo dia, do mês de setembro do ano de dois mil e vinte e um.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

EFEITO ANTIMICROBIANO DO EXTRATO ETANÓLICO DE SOLANUM PALINACANTHUM E SIPARUNA GUIANENSIS EM ESCHERICHIA COLI MULTIRRESISTENTES ISOLADAS DE ALIMENTOS



Documento assinado eletronicamente por **Cecília Nunes Moreira, Professora do Magistério Superior**, em 30/09/2021, às 11:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ariel Eurides Stella, Professor do Magistério Superior**, em 30/09/2021, às 11:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Edismauro Garcia Freitas Filho, Usuário Externo**, em 30/09/2021, às 11:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2349081** e o código CRC **2DD8124D**.

https://sei.ufg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=2542503&infra_sistema=1... 1/2



AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que inúmeras vezes renovou a minha fé me dado motivos para me manter firme em direção aos meus sonhos, pois várias foram as adversidades presentes ao longo do caminho.

Agradeço incansavelmente a minha mãe, Odete Alves Araújo que anda lado a lado comigo em todas as minhas caminhadas, compartilhando os meus sorrisos e chorando as minhas lágrimas, que inúmeras vezes abdica de si, para lutar as minhas batalhas, da mesma forma não canso de agradecer ao exemplo de pai, de homem, e humanidade que tenho, Reginaldo Celestino de Oliveira. Todas as minhas batalhas vocês lutam comigo então todas as minhas vitórias são de vocês.

Agradeço ao meu companheiro de vida, Roberto da Silva por todo apoio e incentivo prestados em todos os meus objetivos, agradeço por acreditar mesmo quando eu já estou a ponto de desistir.

Agradeço ao meu Filho que quando chegou em minha vida eu me encontrava na metade do programa e que apesar de pequenino, teve em muitos momentos seu tempo subtraído para que eu pudesse me dedicar a pesquisa/programa, seguindo em frente. Você meu filho, chegou para somar.

Meus agradecimentos ao meu grande amigo Flávio Barbosa por ter acolhido, direcionado, incentivado, motivado e instruído de forma sabia e amorosa.

Meus mais sinceros agradecimentos a minha orientadora Dr.^a Cecília Nunes Moreira, que compartilhou minuciosamente seus conhecimentos, tendo paciência e sabedoria para me direcionar ao longo de todo o projeto, compreendendo todos os meus erros, limitações, intercursos e ser capaz de extrair o meu melhor.

Gostaria de agradecer aos integrantes que irão compor a banca, Dr. Ariel Eurides Stella e Dr. Edismauro Garcia Freitas-Filho que se dispusera estar presente e agregar seus conhecimentos nesse trabalho.

Assim concluo agradecendo aos meus amigos, aos professores, aos demais profissionais e outras pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste objetivo. Obrigada incansavelmente pelo apoio, dedicação, empenho e por tudo o que cada um deixou de si nessa caminhada, podem ter certeza que aprendi muito com cada um.

Carregarei cada ensinamento ao longo da minha caminhada me comprometendo a sempre intruir e aprender.

“Entrega o teu caminho ao senhor; confia nele, e ele tudo fará.”

Salmo 37:5

**EFEITO ANTIMICROBIANO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *SOLANUM*
PALINACANTHUM E *SIPARUNA GUIANENSIS* EM *ESCHERICHIA COLI*
MULTIRRESISTENTES ISOLADAS DE ALIMENTOS**

Resumo

Escherichia coli são bactérias causadoras de doenças veiculadas a alimentos. Uma problemática identificada é a resistência a antibacteriano causada pela utilização exagerada de antimicrobianos como promotores de crescimento e prevenção de doenças nos animais. Com isso, a busca de novas alternativas para superar essa resistência é relevante. Neste contexto, os extratos naturais, têm sido empregados como alternativa por serem capazes de interagir com ampla variedade de alvos proteicos. As espécies *Solanum palinacanthum* Dunal (Juá) e *Siparuna guianensis* Aubi (Negramina), são plantas nativas do Brasil distintas entre si em aspectos filogenéticos morfológicos e fisiológicos, porém seus extratos podem ter efeito antimicrobiano. Pelo exposto, analisou-se o efeito antimicrobiano dessas plantas em 150 cepas de *E. coli* isoladas de alimentos da bacterioteca da UFJ e realizou-se a caracterização dos grupos patogênicos e filogenéticos, através da PCR. 100% (150/150) de cepas apresentou-se multirresistentes. Os fármacos fosfomicina e colistina foram mais eficazes com 100% e 95,23% respectivamente, diferentemente da penicilina e tiomicosin, que apresentaram resistência em 100% e 95,12%, respectivamente, as amostras foram submetidas aos extratos, porém não apresentaram potencial de inibição da *E. coli*. Não foram identificados os patótipos de EPEC, STEC, EIEC e das 150 onde 62% (94/150) classificados para o filo grupo B1, grupos filogenéticos A ou C, correspondendo a 27% (27/150) do total, do Clado I ou II com 3% (4/150) do total, grupo filogenético B2 com 1% (1/150) do total, grupos filogenéticos D ou E, com 6% (9/150) do total, e o grupo filogenético F sendo o menos frequente, com 4% (6/150) do total. 6% (9/150) das amostras analisadas foram classificadas como grupo indeterminado (U). Conclui-se que *E. coli*, isoladas de alimentos destinados ao consumo humano em Rio Verde e Jataí, Goiás, foram 100% multirresistentes a antimicrobianos testados e compõem grupos filogenéticos potencialmente patogênicos, e na metodologia utilizada os extratos não apresentaram efeito antimicrobiano.

Palavras Chave: enterobactérias, DEC, multirresistência a antimicrobianos, saúde pública, Plantas medicinais do Cerrado.

ANTIMICROBIAL EFFECT OF SOLANUM PALINACANTHUM AND SIPARUNA GUIANENSIS ETHANOLIC EXTRACT ON MULTIRESTANT *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM FOOD

Abstract

Escherichia coli are foodborne disease-causing bacteria. One problem identified is antibacterial resistance caused by the overuse of antimicrobials as growth promoters and disease prevention in animals. Thus, the search for new alternatives to overcome this resistance is relevant. In this context, natural extracts have been used as an alternative for being able to interact with a wide variety of protein targets. The species *Solanum palinacanthum* Dunal (Juá) and *Siparuna guianensis* Aubi (Negramina) are native plants of Brazil that are distinct in morphological and physiological phylogenetic aspects, but their extracts may have an antimicrobial effect. For these reasons, the antimicrobial effect of these plants was analyzed in 150 strains of *E. coli* isolated from foods from the UFJ's bacteriothek and the characterization of pathogenic and phylogenetic groups was carried out by means of PCR. 100% (150/150) of strains were multiresistant. The drugs fosfomicin and colistin were more effective with 100% and 95.23% respectively, unlike penicillin and thiomycin, which showed resistance in 100% and 95.12%, respectively. inhibition of *E. coli*. Pathotypes of EPEC, STEC, EIEC and 150 were not identified where 62% (94/150) classified for the phylum group B1, phylogenetic groups A or C, corresponding to 27% (27/150) of the total, of Clade I or II with 3% (4/150) of the total, phylogenetic group B2 with 1% (1/150) of the total, phylogenetic groups D or E, with 6% (9/150) of the total, and the phylogenetic group F being the least frequent, with 4% (6/150) of the total. 6% (9/150) of the analyzed samples were classified as an indeterminate group (U). It is concluded that *E. coli*, isolated from food intended for human consumption in Rio Verde and Jataí, Goiás, were 100% multiresistant to tested antimicrobials and comprise potentially pathogenic phylogenetic groups, and in the methodology used, the extracts did not show antimicrobial effect.

Keywords: enterobacteria, ethanolic extract, multidrug resistance, public health, Cerrado medicinal plants.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO GERAL	13
1.Referencias	14
2 CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Doenças vinculadas por alimentos	16
2.2 Patotipos de <i>Escherichia coli</i>	17
2.2.1 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica clássica (EPEC)	18
2.2.2 <i>Escherichia coli</i> produtoras de shigatoxina (STEC)	19
2.2.3 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	21
2.3 Grupos Filogenéticos	22
2.4 Susceptibilidade a antimicrobianos convencionais	24
2.5 Conservantes	25
2.6 PLANTAS DO CERRADO COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO	26
2.6.1 <i>Solanum palinacanthum</i> Dunal	26
2.6.2 <i>Siparuna guianensis</i> Aubi	28
2.6.2.1 Caracterização fitoquímica <i>Siparuna guianensis</i> Aubi	29
2.10 Referencias	31
INTRODUÇÃO	44
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1.1 Delineamento experimental	44
3.1.2 Recuperação microbiológica das cepas	45
3.1.3 Obtenção do material botânico e identificação das espécies	45
3.1.4 Obtenção dos extratos das plantas	46
2.3 Teste de sensibilidade por disco de difusão	46
3.1.6 Teste de disco difusão dos extratos brutos de <i>Solanum palinacanthum</i> e <i>Siparuna guianensis</i>	47
3.1.7. Caracterização molecular dos patotipos de <i>E. coli</i>	49
a. Classificação filogenética	49
b. Caracterização dos patótipos de <i>Escherichia coli</i> diarreioigenica	50
3.1.8 Análises de dados	51
3.1.9 Comitê de ética	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 Antibiograma	51
4.2 Avaliação do efeito antimicrobiano do extrato de <i>Solanum palinacanthum</i> em isolados de <i>E. coli</i> por disco difusão e microdiluição.	52
4.3 Avaliação do efeito antimicrobiano do extrato de <i>Siparuna guianenses</i> em isolados de <i>E. coli</i> por disco difusão e microdiluição	53

4.4 Caracterização molecular das <i>E. coli</i> isoladas de alimentos	54
4.4.1 Grupos filogenéticos	54
4.4.2 Caracterização molecular dos patotipos	55
5 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma da metodologia proposta por Clermont et al. (2013).....	24
Figura 2: Folhas e Flores de <i>Solanum Palinacanthum</i>	28
Figura 3: Folhas e Frutos da <i>Siparuna guianensis</i> Aubi	29
Figura 4: Meio cromogenico Harlequin positivo para <i>E. coli</i>	45
Figura 5: <i>Solanum palinacanthum</i>	45
Figura 6: <i>Siparuna guianensis</i>	46
Figura 7: Halo de inibição da <i>E.col</i> frente as dogas convencionaisi.	47
Figura 8: Fases do processo de extração com etanol.	47
Figura 9: Tubos de diluições dos extratos e controles de diluição bacteriana.	48
Figura 10: Placa de petri com disco difusão dos extratos.....	48
Figura 11: Microdiluição do Extrato de Solano palinacanthum e <i>Siparuna guianenses</i> com cepas de <i>Escherichia coli</i>	49
Figura 12: Perfil eletroforético dos produtos da PCR quadriplex	54
Figura 13: Eletroforese em gel de agarose para visualização dos genes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> e <i>E16s</i>	55
Figura 14: Eletroforese em gel de agarose para visualização do gene <i>eaeA</i>	56

1.INTRODUÇÃO GERAL

A oferta de um alimento em boas condições higiênico sanitárias é um importante fator para manutenção e conservação da saúde do consumidor, dessa forma, o controle e inocuidade de todo o processo da cadeia produtiva alimentícia deve ser realizado, evitando riscos à saúde do homem, uma vez que os alimentos mal conservados, processados e preparados podem ser uma importante fonte de infecção (Barbosa et al., 2018).

As Boas Práticas compõem, um conjunto de fatores e procedimentos específicos definidos como os corretos para se desempenhar uma ação, de forma padronizada e que apresente o menor riscos possível. No que desrespeito a alimentos, as Boas Práticas têm por objetivo garantir maior segurança e qualidade dos alimentos, bem como a segurança dos operadores/colaboradores (Anvisa, 2021).

A RDC nº 216/2004 determina que os envolvidos nas atividades de manipulação dos alimentos devem ter conhecimentos mínimos envolvem noções de higiene pessoal, manipulação higiênica dos alimentos e doenças transmitidas por alimentos, assim como correta qualificação para execução das atividades. Entretanto as boas praticas devem se estender até o consumido o qual é envolvido na manipulação final dos alimentos, este deve garantir os critérios básicos de higiênicos durante o preparo e manipulação dos alimentos (Brasil, 2004).

Diversos métodos e tecnologias de controle de microrganismos e conservação de alimentos são empregados para atender às exigências dos consumidores em relação à segurança microbiológica e valores nutricionais, como processamento térmico, uso de conservantes sintéticos e antioxidantes (Brasil, 1997).

Conforme, Portaria nº 540, da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS), aditivo alimentar é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Dentro das classes de aditivos, temos os conservantes, formada por substâncias capazes de impedir ou retardar a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas (Brasil, 1997).

A resistência antimicrobiana é uma grande ameaça à saúde pública global, de forma que poderemos chegar à chamada “era pós-antibiótica”, a qual não terá antimicrobiano que seja capaz de atuar no tratamento das doenças bacterianas e as

infecções tornariam-se fatais. Temos como fator negativo a facilidade de locomoção das pessoas, nacional e internacionalmente, possibilitando uma disseminação bacteriana a nível global. A resistência antimicrobiana consiste em um mecanismo evolutivo natural, e o uso irracional de drogas empregadas nos tratamentos em humanos e animais, e também usada de forma preventiva na agricultura o que vem acelerando esse processo (OMS, 2016).

Com tudo a tendência à utilização de recursos naturais e a problemática da resistência antimicrobiana dos microrganismos às drogas atualmente utilizadas no tratamento de infecções, cresce o interesse em utilizar novos métodos de controle de microrganismos nos alimentos, no intuito de evitar as infecções alimentares (Dastmalchi et al., 2016).

Levando em conta a importância de se monitorar a resistência antimicrobiana e a ocorrência de *E. coli* diarreiogênica em alimentos, bem como considerar alternativas para o controle da resistência bacteriana a antimicrobianos, o presente estudo avaliou o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *E. coli* de alimentos a antimicrobianos convencionais e testou como medida alternativa o efeito antimicrobiano de dois extratos naturais o da *Siparuna guianeses* e o da *Solanum palinacantum* entre os isolados que se apresentaram multiresistentes e relacionou-se aos grupos filogenéticos e patótipos diarreio genicos que pertenceram após a PCR.

1.Referencias

ANVISA, 2021. Guia de Boas Práticas para Bancos de Alimentos. Guia nº 26/2021 – versão 2, de 08/01/2021.

BRASIL. (1997). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Portaria nº 540, 27 de out. de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares – definição, classificação e emprego. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 28 out. 1997, Seção 1.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília. Resolução-RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Diário Oficial da União, 2004.

Dastmalchi, K.; Wang, I.; Stark, R.E. Potato wound-healing tissues: A rich source of natural antioxidant molecules with potential for food preservation, Food Chemistry v.210, p.473–480, 2016.

Organização Mundial da Saúde. Plano de ação global sobre AMR. Genebra: OMS; 2016. (Citado em 27 de dezembro de 2017) Disponível em: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/> [Links]

Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997 - regulamento técnico aditivos alimentares.

2 CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças vinculadas por alimentos

Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA) são todas e quaisquer patologias desencadeadas pela ingestão de alimentos ou água contaminados, sendo considerada infecção quando o agente etiológico é um microrganismo, ou intoxicação quando provocada por toxinas produzidos por microrganismos (Who, 1984; Nunes et al., 2017).

Os agentes biológicos comumente citados na etiologia das DVA são bactérias, vírus, fungos e parasitas. As bactérias são responsáveis pela maior parte destas doenças, sendo *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella spp.*, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* as mais incriminadas e as toxinas como a botulínica, enterotoxina, micotoxinas entre outros (Brasil, 2014; Lammie, 2016).

E. coli e *Salmonella spp* são agentes patogênicos comuns a humanos e animais, sendo, portanto, patógenos de relevância em saúde pública em todo o mundo (Brasil, 2014, Lammie, 2016). A disseminação geográfica de cepas patogênicas intestinais comuns de *Salmonella spp.* e *E. coli* é amplamente mediada por produtos alimentares contaminados, por isso, a oferta de alimentos em boas condições sanitárias é um importante fator para a preservação da saúde do consumidor (Bezzera & Martins, 2008).

O processamento dos alimentos deve seguir critérios básicos de higiene para o controle de contaminações, intoxicações e demais problemas relacionados à má conservação do produto final (Reis, 2013), sendo a manipulação incorreta dos alimentos um dos principais fatores de contaminação, o que pode resultar em riscos à saúde humana (Kindlein et al., 2014).

O alimento seguro não pode ter contaminantes que possam trazer perigo à saúde do consumidor, deve respeitar as concentrações limites de risco determinados pela ANVISA, as quais devem estar especificadas na rotulagem (Souza et al., 2006).

No Brasil, no período de 1999 a 2008, foram registradas 10,7% de surtos de DVA em estabelecimentos de ensino. A justificativa baseia-se no organismo das crianças ser mais susceptível às DVA, pois apresentam sistema imunológico ainda em desenvolvimento, com capacidade reduzida para combater infecções. Outra justificativa seria a pouca produção de ácido clorídrico no estômago, sendo a quantidade produzida insuficiente para combater bactérias nocivas (Lopes, 2014).

Para que haja uma redução no aparecimento de novos casos de DVA é importante uma ação conjunta, bem como empenho multisetorial, entre governo, indústria alimentícia, comércio e consumidor, com adoção de estratégias de prevenção que compreendam

medidas regulamentares, atividades educacionais de vigilância de DVA e monitoramento dos contaminantes (Malacrida et al., 2017).

2.2 Patotipos de *Escherichia coli*

Morfológicamente as células de *E. coli* apresentam-se como bacilos com as extremidades arredondadas, podendo variar sua morfologia sob diferentes condições ambientais, assim como os demais coliformes são bactérias gram-negativas, possui linhagem geralmente móvel pela presença de flagelos peritríquios presentes em toda a periferia celular, podendo apresentar tipos diferentes de fímbrias (curtos pelos de adesão) que aderem especificamente a determinados receptores em algumas linhagens elas apresentam cápsula ou uma camada limosa em torno das células importantes na formação de biofilmes (Paula, 2014).

Fisiologicamente as *E. coli* são bactérias anaeróbica facultativa, vivendo tanto na presença quanto na ausência de oxigênio, fermentando carboidratos como a lactose com a produção de ácido e de gás, sendo esta a base de alguns métodos para sua detecção em água e em alimentos, são mesófilas, mas é classificada como um coliforme termotolerante, pois consegue proliferar em cultura em temperaturas de 45°C que é comum no intestino de animais de sangue quente, bactéria neutrofílica, proliferando melhor em pH próximo à neutralidade, mas sobrevive em solo, na água e em alimentos ácidos por ser capaz de gerar compostos básicos a partir da degradação de aminoácidos (Paula, 2014).

A *E. coli* pertence a um grupo de bactérias clássicas, que normalmente habitam a microbiota intestinal do homem sendo, em sua grande maioria, não patogênicas (Paula, 2014).

A microbiota intestinal compõe um ecossistema que permite ao microrganismo não patogênico e hospedeiro um processo de simbiose, sendo uma colonização desejada, pois a *E. coli* atua como um microrganismo competindo, e assim impede a colonização de outras bactérias oportunistas com potencial patogênicos, essa relação é benéfica para o hospedeiro desde que, o equilíbrio seja estabelecido através de uma dieta sistemática e adequada em prebióticos e probióticos (Saad, 2006).

Entretanto, existe um grupo de *E. coli* diarreiogênicas as quais apresentam fatores de virulência que as tornam capazes de desencadear doenças (Assis, 2016). Esse grupo se dividindo em patotipos. Outro fator importante nessa relação é o hospedeiro, onde crianças, idosos e imunocomprometidos, são o grupo com maior susceptibilidade à infecção,

visto que o sistema imunológico desses indivíduos está mais frágil e susceptível a respostas inflamatórias desregulada, podendo em casos mais severos evoluir para óbito (WHO, 2017).

A resposta do hospedeiro varia também conforme o patotipo, podendo ser *E. coli* produtoras de toxinas Shiga (STEC), que formam um grupo de bactérias patogênicas envolvidas em surtos de DVA, do qual a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) constitui um subtipo, todas as cepas EHEC são patogênicas e constituem um importante grupo de patógenos emergentes transmitidos por alimentos (Macedo et al., 2020).

As *E. coli* enteropatogênica clássicas (EPECs) que causam gastroenterites em humanos e causadora da diarreia infantil. As *E. coli* enterotoxigênicas (ETECs) causam a gastroenterite conhecida como diarreia dos viajantes. As *E. coli* enteroinvasoras (EIECs) causam inflamação da mucosa intestinal semelhante ao quadro produzido pela *Shigella*. A *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* produtora de aderência difusa (DAEC) também causam diarreia especialmente em crianças, sendo todos estes patotipos causadores de surtos vinculados a ingestão de alimentos contaminados (Kyung-Hwan et al., 2014).

Em destaque as STEC são bactérias emergentes relacionadas com a ingestão de alimentos, ligada a um amplo espectro de doenças humanas, apresentando desde uma diarreia branda até severas diarreias sanguinolentas (colites hemorrágicas) que podem evoluir para complicações graves como a Síndrome Hemolítica Urêmica, que pode promover graves sequelas renais levando a uma possível falência renal, e a Púrpura Trombocitopênica, que acometem principalmente idosos (Dera et al., 2016).

Infecções causadas pelas *E. coli* extra intestinais ou uropatogências (ExPEC ou UPEC) estão relacionadas com os fatores de virulência apresentados por elas, conferindo-lhes capacidade de colonizar as superfícies das mucosas do hospedeiro, evadir seus mecanismos de defesas, adquirir nutrientes essenciais para a sobrevivência, lesar ou invadir células do hospedeiro e estimular uma resposta inflamatória (Dera et al., 2016). Dentre os vários fatores de virulência das ExPEC, destacam-se as adesinas (fimH – fimbria do tipo 1; papGII – pili de adesão); toxinas (hlyF – hemolisina); sideróforos (iucD - aerobactina); genes que codificam resistência às defesas do hospedeiro (iss) e invasão do entodélio urogenital (Bower et al., 2005; Siqueira et al., 2009).

2.2.1 *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC)

A EPEC foi descoberta em 1940, sendo o primeiro patotipo definido, e ainda hoje é considerada a mais versátil entre as categorias diarreio gênicas e a principais causas de

diarreia em crianças menores de 5 anos de idade (Albert, 1995; Donnenberg, 1996; Finlay, 2014). As cepas típicas de EPEC são patogênicas para humanos e não são encontradas em animais, enquanto as cepas atípicas são patogênicas para ambos (Tozzoli et al., 2014).

A EPEC foi classificada em 1995 classificada em duas subcategorias: EPEC típica (EPEC-t) e atípica (EPEC-a). As EPEC-t são identificadas pela presença do gene *eae* (EPEC *attaching and effacing*) e plasmídio EAF (EPEC *adherence factor*) que codifica a síntese de uma adesina importante na patogênese das bactérias. As EPEC-a apresentam o gene *eae*, porém são desprovidas do plasmídio EAF portanto, não produzem a fimbria BFP, sendo que são as fimbrias que permitem a ligação das bactérias a célula do mamífero. Tanto EPEC-t como EPEC-a devem ser desprovidas do gene *stx* (Shiga toxina) que caracteriza a STEC/EHEC (Ochoa, et al., 2011).

O mecanismo de patogênese da EPEC se dá através da capacidade da bactéria de injetar desencadear o sistema de secreção tipo III, que consiste em ser a injeção de proteínas efetoras no interior do enterócito, sendo elas as proteínas Tir (receptor translocado de intimina) e EspF. A proteína Tir formará um dímero na membrana dos enterócitos, o qual vai atuar como um receptor para a adesina intimina (gene codificado *eae*) e quando a intimina se liga e ativa a proteína Tir resultará na polimerização da actina nos enterócitos e formação da estrutura do tipo pedestal. Causando a lesão A/E, (Donnenberg; Whittam, 2001). A proteína EspF, cujo gene se localiza na ilha de patogenicidade, causa perda da função da barreira intestinal, através da interrupção das junções estreitas e levando a morte por apoptose das células intestinais, e consequentemente, à diminuição da capacidade de absorção da mucosa intestinal, com ruptura do equilíbrio eletrolítico o que pode resultar em diarreia (Donnenberg; Whittam, 2001).

2.2.2 *Escherichia coli* produtoras de shigatoxina (STEC)

A STEC teve seu reconhecimento como uma classe patogênica dividido em dois momentos. O primeiro em 1977, classificada quanto a capacidade da cepa, pertencer aos sorogrupos O18, O26, O111, O126 e O128, é capacidade de produzir toxinas que causavam efeito citopático irreversível em células Vero (células de rim de macaco verde africano) Konowalchuk, Speirs e Starvic em 1997, surgindo o termo verotoxina ou verocitotoxina (Konowalchuk et al.,1997).

O segundo momento em 1983, com relatos de um sorotipo de *E. coli*, O157:H7, seria responsável por um surto de diarreia sanguinolenta, ligado ao consumo de

hambúrgueres contaminados e mal cozidos. Este quadro clínico foi denominado colite hemorrágica, por Riley em 1983, onde foi possível correlacionar as bactérias como do mesmo grupo devido ao seu comportamento bioquímico e atividades biológicas (Riley et al., 1983).

Sua patogenicidade, é devido a capacidade de aderir ao epitélio do intestino grosso, onde impede a síntese protrica e ocorre a autofagia gerando assim a morte celular outro efeito secundário é a alteração da célula endotelial, onde atua como um ninho de ativação da cascata de coagulação levando a microtombos e causando necrose isquêmica através do consumo de plaquetas e fragmentação das hemáceas colites hemorrágicas (diarreias com sangue) por ação da toxina shiga (*stx*) denominada *stx1* e *stx2*, ambas toxinas, são responsáveis por inibição da síntese proteica, causando danos no epitélio intestinal, podendo levar desde uma diarreia leve a uma colite hemorrágica e/ou até mesmo para Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) (Loukiadis et al., 2006).

Os genes que codificam Stx estão presentes e são transferidos por bacteriófagos para as cepas de *E. coli*. As Stx possuem uma estrutura do tipo A1B5, onde as cinco subunidades B são responsáveis pela ligação da toxina à célula alvo e a subunidade A é o componente ativo da toxina. O receptor para Stx é o Gb3 (*globotriaosylceramide*), presente nas células de Paneth da mucosa intestinal e nas células epiteliais dos rins de seres humanos, ou Gb4 (*globotetraosylceramide*) para Stxe, presente no endotélio vascular e enterócitos de suínos. A toxina Stx pode atravessar o epitélio intestinal por meio de endocitose seguido por exocitose na parte basal do enterócito, mas o mecanismo não está totalmente elucidado. Em seres humanos e leitões, a Stx cai na corrente sanguínea e se une aos receptores endoteliais. As Stx atuam em células endoteliais dos vasos sanguíneos da mucosa gastrointestinal, dos rins, do cérebro e outros tecidos, causando extravasamento de líquido, hemorragias, a nefrotoxicidade observada em seres humanos e a neurotoxicidade observada em leitões com doença do edema. Ruminantes não possuem esses receptores para Stx no endotélio vascular, mas os mesmos estão presentes nos enterócitos das criptas, linfócitos intraepiteliais e macrófagos da mucosa intestinal. EHEC/STEC também podem colonizar o intestino dos ruminantes, embora não causem lesões vasculares e, por isso, sinais sistêmicos não são observados. Após a entrada da toxina na célula, a subunidade A remove uma adenina do rRNA 28S do ribossomo eucariótico, alterando sua função e resultando em inibição da síntese proteica, o que é letal para a célula (Mainil & Daube, 2005; Croxen & Finlay, 2010; Mainil, 2013).

São existentes até a data três subtipos de Stx1 (Stx1a, Stx1c, Stx1d) e sete subtipos de Stx2 (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g), sendo que as cepas produtoras de Stx2a, Stx2c e ou Stx2d são frequentemente associadas a síndrome hemolítica urêmica dos seres humanos. As cepas de *E. coli* produtoras de Stx2e são de grande importância em suinocultura, pois causam a doença do edema em suínos (Mainil, 2013).

Estudos apontam uma alta porcentagem de bezerros infectados com estes patótipos, porém não apresenta sinais clínicos, entretanto estes animais constituem importante reservatório de STEC/EHEC tanto para bovinos como para o homem. Em 2011, houve uma grande epidemia causada por um sorotipo raro de *E. coli* patótipo STEC e sorotipo O104:H4, envolvendo mais de 4.000 pessoas em 16 países europeus (Gyles & Fairbrother, 2010).

Nem todos os STEC são patogênicos para o homem. A gravidade varia conforme a quantidade de microrganismo, imunidade do hospedeiro e toxinas, e pode apresentar sinais clínicos brandos como uma diarreia branca sem complicações até a colite hemorrágica com intensa dor abdominal e diarreia sanguinolenta, com pouca ou nenhuma febre (Murray et al., 2014).

2.2.3 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

A *Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC), causam doença nos países desenvolvidos, colonizando tanto intestino de adultos quando de crianças, causando colites hemorrágicas, (diarreias sanguinolentas) e podendo causar complicações mais graves, como, a síndrome urêmica hemolítica (SHU) que evolui para falência renal, podendo ser fatal, principalmente em crianças (Paula, 2014), sendo o sorotipo O157:H7 isolado de EHEC em pessoas doentes nos Estados Unidos, no Japão e no Reino Unido (Lim et al., 2010).

As EHEC podem ou não possuir plasmídeo pO157, os quais possuem genes de virulência, que confere à cepa maior patogenicidade e mecanismos de escape para as respostas imunes do hospedeiro (Lim et al., 2010; Murray et al., 2014). Produzindo, toxinas idênticas às produzidas pela *Shigella dysenteriae* tipo I, conhecidas como Shiga-toxinas (Stx1 e Stx2) (Gomi et al., 2015). Onde possuem subunidades A e B, sendo que a subunidade A1 da Stx2 tem uma afinidade maior para os ribossomos e maior atividade catalítica do que a subunidade A1 da Stx1 que configura a síntese de proteína perturbada e a morte da célula rRNA 28S (Basu et al., 2015). STEC das EHEC se diferem devido a

EHEC possui a ilha de patogenicidade LEE, desse modo, é capaz de causar a lesão A/E, semelhante à induzida pela EPEC (Croxen & Finlay, 2010).

Nas EHEC a liberação das toxinas acontece através da lise do fago, que é um codificador da toxina em resposta a danos no DNA bacteriano, por isso antimicrobiana terapia não deve ser usada em infecções por EHEC, pois aumenta a liberação da toxina agravando a síndrome (Croxen & Finlay, 2010).

E. coli enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* produtora de toxina Shiga toxina (STEC), também conhecida como *E. coli* verotoxigênica (VTEC), em função do efeito citotóxico em células Vero, se referem a cepas de *E. coli* que produzem pelo menos uma das toxinas Shiga (Stx1 ou Stx2) (Gyles 2007). Outro fator de virulência importante para a caracterização de EHEC é a presença da ilha de patogenicidade LEE (*locus of enterocyte effacement*), com genes responsáveis pela formação de A/E, como em EPEC. EHEC possui a mesma LEE de EPEC, porém o mecanismo de formação da estrutura semelhante ao pedestal é ligeiramente distinto das EPEC: não ocorre fosforilação de Tir pela célula hospedeira, a formação de pedestal é independente de Nck, o rearranjo de actina é mediado por TccP (*Tir cytoskeleton-coupling protein*), que se liga ao Tir por meio de proteínas da célula alvo IRTKS (*insulin receptor tyrosine kinase substrate*), que interage com N-WASP para ativar o complexo ARP2/3 (Croxen & Finlay, 2010).

A diferenciação das EHECs e STECs principalmente se dá em relação à liberação das toxinas, onde as EHEC não possuem mecanismo de liberação e essa liberação acontece após a morte celular bacteriana, o que quando empregado antibioticoterapia agrava a síndrome hemolítica urêmica, pois quanto mais morte bacteriana, mais liberação de toxinas (Croxen & Finlay, 2010).

2.3 Grupos Filogenéticos

Os grupos filogenéticos contemplam uma parte significativa de uma análise exploratória de sequências de DNA e proteínas, permitindo traçar o caminho evolutivo e epidemiológico de agentes etiológicos de doenças e/ou o caminho evolutivo de seus hospedeiros (Caldart et al., 2016). Uma árvore filogenética é uma representação gráfica de relações ancestral-descendente entre organismos ou sequências genéticas, e deve ser considerada como uma hipótese de um relacionamento evolutivo entre um grupo de organismos.

Patógenos como a *E. coli*, são frequentemente isolados de amostras de alimentos por serem bactérias com potenciais riscos de infecção para os consumidores e em paralelo

vem passando por uma forte pressão seletiva o que lhe confere evolução frente aos tratamentos e métodos empregados para inibir o crescimento bacteriano (Lentz, 2018).

Clermont et al. (2000) em seus estudos identificou quatro filo grupo (A, B1, B2 e D), posteriormente, validaram uma nova análise filogenética em que cepas de *E. coli* atualmente são classificadas em oito grupos filogenéticos principais (A, B1, B2, C, D, E, F e clado I. A tipagem genética permite que as estipes sejam classificadas em um dos grupos achados através da reação em cadeia de polimerase (PCR), uma das técnicas mais empregadas para essa classificação. Na metodologia proposta por Clermont et al. (2013) a nova classificação das cepas foi realizada por uma PCR quadruplex, que é uma técnica empregada para a amplificação simultânea de quatro alvos no material genético (Figura 01) (Clermont et al., 2013).

Os filos grupos A e B1 predominam em cepas intestinais que colonizam o intestino de humanos saudáveis, além de ser a classe de bactérias que possui a maior taxa de resistência a antibióticos quando comparadas aos grupos B2 e D (Clermont et al., 2013). A barreira entre o comensalismo e virulência resulta de um equilíbrio complexo entre o estado do hospedeiro e a expressão de fatores de virulência da bactéria (Picard et al., 1999).

O grupo A é considerado uma linhagem distinta que compreende a cepa K12, e está mais relacionada a isolados obtidos de cepas comensais da microbiota humana. Já o grupo B1 é prevalente em *E. coli* isolada de mamíferos (Silva, 2015).

As bactérias extras intestinais capazes de causar doenças entéricas constituem entre os filos grupos B2 e D, caracterizados pelos aspectos de virulência. O filo grupo B2 se dá por um dos mais antigos grupos que teve origem monofilética. Já o grupo D constitui dois ramos filogenéticos, um surgido primordialmente como subgrupo B2 e outro ramo que emergiu posteriormente (Lara, 2017).

O grupo F é composto de linhagens que partilham características em comum a dos grupos B1. O filo grupo C também se refere em semelhança ao filo grupo B1 assim como o grupo F. Os filos grupos F e B2 são os mais basais, sugerindo que são os primeiros grupos ancestrais, e com isso os filos grupos divergentes A, B1 e C surgindo mais recentemente. O grupo D é mais diversos do que grupo C, que é mais clonal, assim como o filo grupo E, sendo os filos grupos A e B1 mais diversos (Coura, 2016).

Alguns estudos tentaram identificar a origem evolutiva da *E. coli* extra intestinais usando análise de marcadores patogênicos para classificar os isolados em diferentes

grupos filogenéticos (Johnson et al. 2001; Luna et al. 2010; Moulin-Schouleur et al. 2007). No entanto, a acumulação acelerada de dados de sequências moleculares de diversos organismos, possibilitou novas ferramentas para o entendimento da evolução das doenças (Caldart et al., 2016).

Figura 1: Fluxograma da metodologia proposta por Clermont et al. (2013).

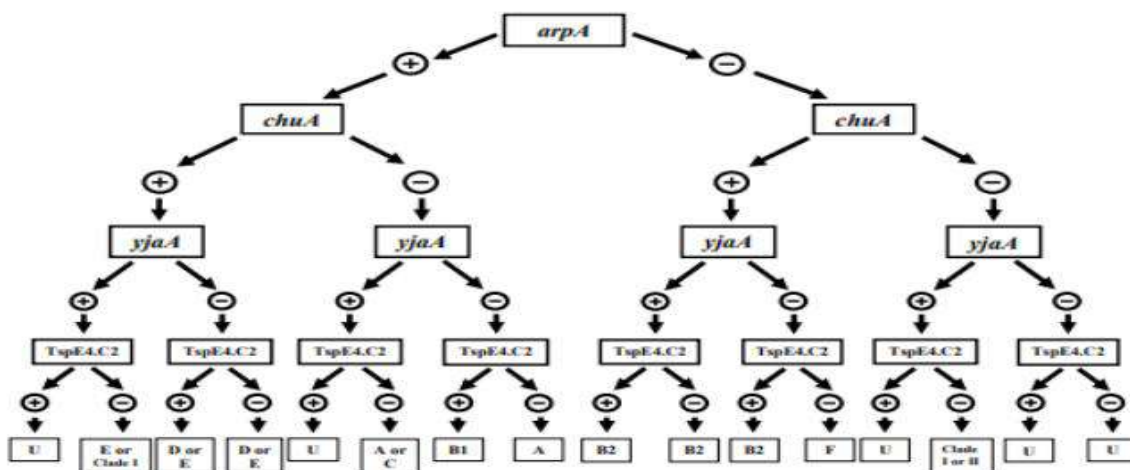


FIG 1: Metodologia usada para distinção dos grupos filogenéticos

2.4 Susceptibilidade a antimicrobianos convencionais

Os antimicrobianos estão listados como um dos avanços mais significativos da ciência moderna e até os tempos atuais a medicina se baseia no emprego racional dos mesmos. No entanto, esses microrganismos possuem mecanismos evolutivos que somados à pressão seletiva do uso terapêutico irracional dos antibióticos faz com que os graus de resistência bacteriana creça exponencialmente (Mendonça, 2020).

Segundo Tamma & Simner (2018), a resistência dos microrganismos vem aumentando em vários antimicrobianos testados, mesmo aqueles que não são utilizados rotineiramente pelo homem, porém utilizados na terapêutica médica veterinária, concluindo que os genes de resistência podem ser transmitidos entre as espécies, por meio de plasmídeos. Portanto, o consumo de alimentos contaminados por agentes bacterianos pelo homem facilita a transmissão destes agentes resistentes, causando um grave problema de saúde pública. Dessa maneira, são necessários estudos mais abrangentes com relação à resistência no Brasil, a fim de diminuir os impactos na saúde pública e consolidar o mercado brasileiro no cenário internacional (Silva e Lincopan, 2012).

A resistência a antimicrobianos é uma problemática importante na Medicina Veterinária e saúde pública, e o conhecimento de quais antimicrobianos tem efeitos sobre a *Escherichia coli* e *Salmonella* spp é relevante, tanto para eficiência do tratamento quanto para o controle do aumento da resistência destes microrganismos. Um quadro alarmante que favorece este aumento de resistência é a falta de sistemas de saneamento eficazes, que permite o lançamento de esgoto de hospitais e domicílios, sem o tratamento adequado. No meio ambiente estas bactérias entram em contato com outros microrganismos e antibióticos, fomentando um novo processo de seleção que potencializa a resistência.

2.5 Conservantes

Os conservantes mais comumente utilizados nas indústrias alimentícias, são: Benzoato de sódio, que é obtido a partir da neutralização do ácido benzoico por hidróxido de sódio, e apresenta a fórmula química $C_6H_5 COOH Na$. Embora o ácido benzoico não dissociado seja o agente antimicrobiano mais efetivo, usa-se preferencialmente o benzoato de sódio por ser cerca de 200 vezes mais solúvel em água. Apresenta poucos efeitos tóxicos, embora seja relatado pela literatura asma e urticárias (Who, 2016).

O grupo dióxido de enxofre e sais de enxofre possui como representantes os Metabissulfito de sódio e Bissulfito de sódio, possuem ação contra o escurecimento enzimático e não enzimático, no controle microbiológico, como antioxidante e agente branqueador atuando também como agentes inibidores de mofo e leveduras (Filla, 2016)

Sorbato de potássio, representa o 3º maior grupo de conservantes utilizados nos mais diversos tipos de alimentos tais como bebidas pastelaria e padaria parcialmente cozida, queijos, frutas e legumes em conserva ou cristalizadas, azeitonas, compotas e geleias, dentre outros (Silva & Lidon, 2016). Seus efeitos colaterais em altas dosagens são possíveis alergias, geralmente urticária.

Com a tendência à utilização de recursos naturais e a problemática da resistência antimicrobiana dos microrganismos às drogas atualmente utilizadas no tratamento de infecções, cresce o interesse em utilizar novos métodos de controle de microrganismos nos alimentos, no intuito de evitar as infecções alimentares (Dastmalchi et al., 2016).

Já é relatado na literatura alternativas reconhecidas pelo Food and Drug Administration (FDA) como: Mangericão, pimenta preta, sálvia, canela, coentro, erva doce, gengibre, limão entre outros (Ribeiro, 2017).

E pesquisas apontam novas alternativa a qual valida a eficácia desses produtos naturais como alternativa ao uso dos conservantes sintéticos, como o extrato natural do orégano em que mostrou eficácia na conservação de produtos cárneos onde apontou como substituinte dos químicos BHT – butil-hidroxi-tolueno e eritorbato de sódio (Fernandes, 2016).

2.6 PLANTAS DO CERRADO COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO

2.6.1 *Solanum palinacanthum* Dunal

Solanum palinacanthum joá-ti, conhecida popularmente por mingola, melancia-da-praia, juá bagudo, é uma espécie da família Solanaceae, encontrada em zonas tropicais e temperadas, incluindo o Cerrado brasileiro. Esta família tem grande importância para a indústria alimentícia, pois abriga frutos muito utilizados na culinária nacional, como tomate, berinjela, pimentas e pimentões (Souza e Lorenzi, 2019). O amplo uso medicinal da família está representado pelas espécies *Atropa belladonna* L., *Datura stramonium*, *Hyoscyamus niger*, entre outras, produtoras de potentes alcaloides como atropina, hyosciamina e escopolamina, sendo utilizadas em doenças gastrointestinais e úlceras e a atropina como antídoto para intoxicação com organofosforados e bradicardia (Olmstead & Bohs, 2007).

É importante ressaltar que a *Solanum palinacanthum* já vem sendo utilizada pela indústria farmacêutica laboratórios Belfar ®), com o lançamento da Ierobina que é um medicamento utilizado para auxiliar na digestão e proteção do fígado contra o álcool (Belfar ®).

Segundo Leeser (1962) que se posiciona a favor de medicamentos homeopática (sua patogenesia) é relacionada com a concentração de alcalóides, nas medicações proveniente da família das Solanaceae, que contém maiores quantidades de atropina (dl-hiosciamina) e escopolamina (hioscina), que são alcalóides pertencentes ao mesmo grupo químico, semelhantes aos alcalóides advindos da espécie *Atropa belladonna* L. Esses compostos são classificados como antagonistas de receptores muscarínicos. Apesar de possui atuação inespecífica nestes receptores, que se encontra distribuídos de forma heterogênea no corpo humano. Esses antagonistas evitam os efeitos da acetilcolina bloqueando os receptores colinérgicos muscarínicos dos locais neuroefetores da musculatura lisa, músculo cardíaco e células glandulares; dos gânglios periféricos; e do

sistema central. Atuam pouco como bloqueadores dos efeitos da acetilcolina nos receptores nicotínicos (Goodman & Gilman, 1996).

O gênero *Solanum* ocorre em todo território brasileiro e é representado por 288 espécies, sendo 143 endêmicas, ou seja, só ocorrem no país (Stehmann et al., 2015). Outros estudos taxonômicos sobre o gênero *Solanum* foram realizados por Sendtner (1846), Smith & Downs (1966), Carvalho (1985), Stannard (1995), Agra (1999a; 2006; 2007), Agra et al., (2003), Mentz & Oliveira (2004) e Carvalho & Bovini (2006). Outros autores descreveram novas espécies em várias regiões do país (Agra, 1992; Angra, 1999b, Agra & Nee, 1997; Carvalho & Bovini, 2006; Knapp, 2002; Mentz & Nee, 2003).

No bioma Cerrado, ocorrem 70 espécies incluindo *S. palinacanthum*, comum em áreas antrópicas (alterações do homem no meio ambiente). Trata-se de uma espécie arbustiva, de caule aéreo, folhas simples, aculeadas, com tricomas, inflorescência do tipo cimeira opositifolia, com flores de cálice lobado e corola estrelada (figura 2). Fruto orbicular, esverdeado com listas amarelas e sementes achatadas (Stehmann et al., 2015).

Em se tratando de medicina popular, os indígenas Guarani-Kaiowá utilizam da seiva de *S. palinacanthum* para tratar tumores (Million, 2017). No município de Padre Bernardo – GO, utilizam para tratar furúnculo (Million, 2017). Comunidades do Piauí utilizam *S. palinacanthum* para tratar dores nos rins e tuberculose (Oliveira; Barros; Moita-Neto, 2010). Na literatura encontra-se pesquisas que destacam ações inibitórias de extrato de *Solanum Palinacanthum* sobre diferentes microrganismos, como *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella typhimurium* (Bouzada et al., 2009; Nogueira et al., 2007).

Segundo Lobô (2010), a *Solanum paniculatum* demonstrou melhor atividade contra maior número de microrganismos ensaiados (*S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*). Essa atividade foi exolicada relacionando à grande quantidade de classes alcalóides e taninos presentes neste extrato. *Solanum trilobatum* Linn apresentou atividade bacteriana contra *Klebsiella* sendo o seu extrato aquoso e *Staphylococcus aures* com o extrato etanólico (Latha & Kannabiran, 2006).

Pereira et al. (2018), isolaram pela primeira vez a rutina, um flavonóide amplamente distribuído no reino das plantas, que apresenta diversas atividades biológicas,

possui ação antimicrobiana, e foi isolada nas folhas de *Solanum paniculatum*. O segundo composto isolado nesse estudo foi o ácido 3,5-dicafeoilquínico em que os pesquisadores relataram a atividade antibacteriana e antifúngica dessa substância (Zhu et al., 2004), também identificado atividade antiviral (Li et al., 2005). As atividades antioxidante (Wang et al., 2003), antiproliferativa, inibidora da tirosinase e anti-hipertensiva também foram atribuídas a este composto. Resumindo, as substâncias responsáveis pelas propriedades antimicrobianas do extrato de folhas de *S. palinacanthum* foi isolado e identificado como rutina e ácido 3,5-dicafeoilquínico (Iwai et al., 2004; Mishima et al., 2005).

Muitos estudos têm mostrado as espécies de *Solanum* como um rico estoque de diversos alcalóides. Em estudos farmacológicos, esses compostos exibiram atividades biológicas promissoras tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Além disso, os fabricantes de medicamentos têm feito uso desses alcalóides como moléculas principais na síntese de novos medicamentos esteróides para vários tratamentos, na *Solanum palinacanthum* é o Solamargine representando um glicosídeo alcaloide esteroide (Chowanski et al., 2016)

Figura 2: Folhas e Flores de *Solanum Palinacanthum*.



FIG 02: Folhas, caule, flores e frutos da planta *Solanum palinacanthum*.

2.6.2 *Siparuna guianensis* Aubi

A *Siparuna guianensis* Aubi conhecida popularmente como negramina, cafezinho, erva de rato, catingueiro, limão bravo, pertencente à família Siparunaceae, possui 20 espécies no Brasil, sendo quatro endêmicas. *S. guianensis* é uma planta aromática, nativa da América do Sul, ocorrendo em áreas florestais. No Cerrado, se encontra presente nas raras florestas e relevantes reservatórios de biomassa medicinal do Cerrado brasileiro, estando restrita aos diversos ambientes, sendo recomendada como planta prioritária

quando se trata de conservação (Montanari, 2010). Suas folhas são as partes da planta com maior utilização popular, sendo uma importante matéria prima para uso prospectivo devido ao seu potencial antimicrobiano, biomassa medicinal e rendimento (Valentini et al., 2013).

A espécie *S. guianensis* se apresenta na forma de arbusto de caule acinzentado e altura entre 5 a 15 metros no Cerrado (figura 3). A planta é do tipo perenifólio e possui maior perda de folhas durante a seca. No entanto, tem brotação ao longo do ano, sendo mais expressiva no fim das águas, apresentando maior rendimento de compostos voláteis no período de emissão dos botões florais. As flores são monóicas e possui frutos de cor verde a vermelho (Valentini et al., 2013).

Figura 3: Folhas e Frutos da *Siparuna guianensis* Aubi



FIG 03: Folhas, caule e frutos da planta *Siparuna guianensis* Aubi.

2.6.2.1 Caracterização fitoquímica *Siparuna guianensis* Aubi

A caracterização fitoquímica qualitativa do extrato de *Siparuna guianensis* e a análise por cromatografia em camada delgada revelou que o extrato etanólico e acetato de etila e frações aquosas foram selecionados para a presença de taninos, compostos fenólicos, flavonóides e saponinas (Carvalho et al., 2020).

As funções descritas na literatura para o tanino estão relacionadas, com suas propriedades adstringentes. Quando ingerido este agente possui efeito antidiarréico e

antibacteriano, quando utilizado de forma externa, possui efeito impermeabilizante da pele e mucosas, conferindo proteção as camadas subjacentes (Bruneton, 1991). Ao precipitar proteínas, oferecem um efeito antimicrobiano e antifúngico. Se trata de um composto hemostáticos e, por precipitarem alcalóides, são antídoto para casos de intoxicações. Os taninos atuam na formação de camada protetora para os casos de cura das feridas, queimaduras e inflamações (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados, e logo abaixo dessa camada, ocorre a cura naturalmente (Melo, 2001). Compostos fenólicos são oriundos do metabólitos secundário das plantas, quando em quantidade superior aos níveis normais indicam resposta ao estresse que pode ser por fitopatógenos, lesões causadas por herbívoros, radiação solar, dentre outros (Nicholson, 1992; Alcantara et al., 2018; Beckman, 2000). Esses compostos possuem ação bactericida, fungicida, antiinflamatória (Preethi et al., 2012) e anti-radicalar, tendo o seu uso também, como estabilizadores de alimentos (Alcantara et al., 2019).

Os flavonoides possuem amplo efeito terapêutico, são moléculas polifenólicas que apresentam propriedades antimicrobiana, antioxidante, osteogênica e antiosteoclastogênica (Domitrovic, 2011). Entre esses compostos temos, a taxifolina, um flavonoide tipo catecol, isolado de diversas plantas (Park et al., 2016), apresenta ação antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (Jeong et al., 2009), *Acinetobacter hemolyticus* (Chatzopoulou et al., 2010); atividade antifúngica (Kanwal et al., 2010); capacidade de estimular o aumento da expressão gênica de osteocalcina, osteoprotegerina e sialoproteína óssea, além de diminuir a expressão de RANKL (marcador de reabsorção óssea) em osteoblastos (Satué et al., 2013) e estimular a diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos (Wang et al., 2017).

Nas últimas décadas, as saponinas têm sido estudadas em todo mundo devido às suas características: presente em abundância nas plantas, baixa toxicidade e alta eficiência, apresentando pouco efeitos colaterais (Zhao, 2018). Os efeitos terapêuticos das saponinas são; cardiovascular, antidiabético, hipoglicemia, antioxidante, antiasma, anti-eczema, antiinflamatório, antiartrítico, antidiabético e redutor de colesterol, imunomodulador, citotóxico, antiparasitário, antiviral, antifúngico (Kalinin, 2008; Bahrami, 2016), anticâncer (Aminin, 2015; Yun et al., 2018), antiangiogênese, antiproliferativo (Zhang, 2017) e atividades antidemência.

Com base na literatura, saponinas tem efeitos neuroprotetores que atua na diminuição de doenças do sistema nervoso central (Alzheimer, Huntington, Parkinson e derrames, Decroo, 2017). Também estimulam a apoptose e prevenir o crescimento de células tumorais (Bahrami, 2016); apresentam atividades biológicas, como a redução da hiperlipidemia, regulação do acúmulo de gordura, restrição do fígado gorduroso, alívio da hiperuricemia, controle do açúcar no sangue, inibição da gota e estimulação da função hematopoética da medula óssea (Zhao, 2018).

2.10 Referencias

Agra, M.F. & Nee, M. A New Species of *Solanum* subgenus *Leptostemonum* (Solanaceae) from Northeastern Brazil. *Brittonia*, v. 49, p.350-353, 1997.

Agra, M.F. 2007. Diversity and Distribution of *Solanum* subgenus *Leptostemonum* in Brazil. p. 31-43. In: SPOONER, D.M.; BOHS, L.; GIOVANNONI, J.; OLMSTEAD, R.G.; SHIBATA, D. (orgs.). *Acta horticulturae - vi international solanaceae conference: genomics meets biodiversity*. Madison, Wisconsin, International Society for Horticultural Science, v. 745.

Agra, M.F. Diversity and distribution of *Solanum* subgenus *Leptostemonum* in North-East of Brazil. p. 197-203. In: NEE, M.; SYMON, D.; LESTER, R.N.; JESSOP, JP (eds.). *Solanaceae IV: Advances in Biology and Utilization*. Kew, Royal Botanical Gardens, 1999.

Agra, M.F. Solanaceae. p. 146-148. In: BARBOSA, M.R.V.; SOTHERS, C.; MAYO, S.; GAMARRA, C (orgs.). *Checklist das Angiospermas do Nordeste*. Brasília, Ministério da Ciência e Tecnologia, 2006.

Agra, M.F.; Galassi, S.; Nee, M. & Silva, M.M. Lista das plantas Vasculares de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil: Solanaceae. *Boletim de Botânica (USP)*, v. 21, p.388-389, 2003.

Albert MJ, Faruque SM, Faruque AS, Neogi PK, Ansaruzzaman M, Bhuiyan, et al. Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. *J Clin Microbiol*. 1995 Apr;33(4):973-7.

Albert MJ. Epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection in Bangladesh. Rev Microbiol. 1996;27(1):17-20.

Alcantara, M. A.; Polari, I. de L. B.; Meireles, B. R. L de. A.; De Lima, A. E. A.; Junior, J. C. da S.; Vieira, E.A, N. A.; Codeiro, A. M. T. de M. Effect of the solvent composition on the profile of phenolic compounds extracted from chia seeds. Food Chemistry, v. 275, p. 489-496, 2019.

Almeida, A.E.; Cardoso, C.R.P.; Almeida, D.V.; MoreirA, R.R.D.; Silva, M.; Varanda, E.A. Mutagenic Activity of Glycoalkaloids from *Solanum palinacanthum* Dunal (Solanaceae) found in the Brazilian cerrado. Latin American Journal of Pharmacy, v.29, p.122-126, 2010.

Amézquita, M, Z; Tamborski M, Kopsombut UG, Zhang C, Arzuza OS, Gómez, D, OG. Relação genética entre patótipos de *Escherichia coli* isolados de produtos alimentícios para consumo humano em Cartagena, Colômbia. Pathog Foodborne Dis. 2015; 12 (5): 454-461. doi: 10.1089 / fpd.2014.1881

Aminin D.L., Menchinskaya E.S., Pisliagin E.A., Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I. Anticancer activity of sea cucumber triterpene glycosides. Mar. Drugs. 2015; 13:1202–1223. doi: 10.3390/md13031202.

Angeles, G.R. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Publica Mex. 2002 sep;44(5):464-75

Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from broiler chickens. Veterinary Medicine International, 2014; 2014:195189. doi: 10.1155/2014/195189. Epub 2014 Nov 24.

Korb A., Nazareno E.R., Costa L.D., Nogueira K.S., Dalsenter P.R., Tuon F.F.B. & Pomba M.C. 2015. Molecular typing and antimicrobial resistance in isolates of *Escherichia coli* from poultry and farmers in the Metropolitan Region of Curitiba, Paraná Pesq. Vet. Bras. 35(3):258-264, março 2015 Paraná1 DOI: 10.1590/S0100-736X2015000300008

Assis, F. M. A. Perfis genéticos e resistência a antimicrobianos de estirpes de *Escherichia coli* diarreogênicas e *Salmonella* spp. isoladas no estado do Paraná. Curitiba. 2016. 95 p. Tese (Mestrado). Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Pará

Bahrami Y., Franco C.M.M. Acetylated triterpene glycosides and their biological activity from holothuroidea reported in the past six decades. *Mar. Drugs*. 2016; 14:147. doi: 10.3390/md14080147.

Beckman, C.H. Phenolic-storing cells: Keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 57, n. 3, p. 101-110, 2000.

Bessa, N.G.F.; Borges, j.c.m.; Beserra, F.P.; Carvalho, R.H.A.; pereira, M.A.B.; Fagundes, R.; Campos, S.L.; Ribeiro, L.U.; Quirino, M.S.; Chagas, A. F.; Alves, A. Prospecção fotoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde - Tocantins. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.15, n.4, p.692-707, 2013,

BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, v.66, n.4, p.1085-1113, 2015. (DOI: 10.1590/2175-7860201566411)

Bower, J. M; Eto, D.S.; Mulvey, A. A Covert operation of Uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic*, v .6, p 18-31, 2005

Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Nota Técnica *Salmonella* CRISC, Brasília, 2018. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/arquivos-publicacoes-dipoa/entenda-melhor-salmonela-em-carne-de-frango.pdf>>Acesso em: 19 jun 2018.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 216/2014: Cartilha sobre Boas Práticas para Serviços de Alimentação. 3 ed. Brasília: Ministério da Saúde. Diário oficial da união, 18 nov, 2014

Brooks, G. F.; Carroll, K.C.; Butel, J. S.; Morse, S. A.; Jawetz, Melnick E Adelberg: *Microbiologia Médica*. 24 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 820p, 2009

Bruneton, J.; *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*, Ed. Acribia, SA: Espanha, 1991.

Caldorin, M.; Almeida, I.A.Z.; Peresi, J.T.M.; Alves, E.C. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. Instituto

Adolfo Lutz – Centro de Laboratório Regional de São José do Rio Preto. REVISÃO, ed. 110, p.4-20. 2013.

Canizalez, R, A; Gonzalez, N, E; VIDAL JE, Flores, V.H; LEÓN, S, N; Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. Int J Food Microbiol. 2013 Jun;164(1):36-45.

Cardoso, A. L.S P.; Kanashiro, A.M. I.; Stoppa, G. F. Z.; Castro, A. G. M.; Luciano, R. L.; Tessari, E. N. C. Avaliação do perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isolada de aves comerciais. Nutritime, v. 12, n. 2, p. 3980-3988, mar./abr. 2015.

Cardoso, P.; MARIN, J.M. resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* provenientes de queijo muçarela artesanal produzido no Brasil. ARS Veterinária, Jaboticabal, SP, v.30, n.2, 104-108, 2014.

Carvalho, L.D'A.F. Flora fanerogâmica da reserva do parque estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brasil. Solanaceae. Hoehnea, v.12, p.67-85, 1985.

Carvalho, L.D'A.F.; BOVINI, M.G. Solanaceae na Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. Rodriguésia, v. 57, p.75-98, 2006.

Carvalho, V.; Ramos, L.; Silva, C.; Nebo, L.; Moraes, D., Da silva, F.; Rodrigues, R. In vitro anthelmintic activity of Siparuna guianensis extract and essential oil against Strongyloides venezuelensis. Journal of Helminthology, v.94, p. 1-5, 2020. doi:10.1017/S0022149X19000282

Chatzopoulou A, Karioti A, Gousiadou C, Lax Vivancos V, Kyriazopoulos P, Golegou S, Skaltsa H. 2010. Depsides and other polar constituents from Origanum dictamnus L. and their in vitro antimicrobial activity in clinical strains. J Agric Food Chem. 58 (10): 6064-8. doi: 10.1021/jf904596.

Chowanski S, Adamski Z, Marciniak P, Rosinski G, Buyukguzel E, et al. (2016) Uma revisão da atividade bioinseticida de alcalóides Solanaceae. Toxins (Basel) 8 (3): 60-70.

Chung, P.Y.; Navaratnam, P.; CHUNG, L. Y. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. Annals of clinical microbiology and antimicrobials, v.10, n.25, p. 1-6, 2011.

Clermont, O., Bonacorsi, S., And bingen, E. (2004) Characterization of an anonymous molecular marker strongly linked to *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis. J Clin Microbiol 42: 1770–1772.

Clermont, O., Lescat, M., O'Brien, C.L., Gordon, D.M., Tenaillon, O., and Denamur, E. (2008) Evidence for a humanspecific *Escherichia coli* clone. Environ Microbiol 10: 1000–10006.

Clermont, O.; Christenson, J.K.; Denamur, E.; Gordon, D.M. The Clermont *Escherichia coli* phyllo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phyllo-groups. Environmental Microbiology Reports, Hoboken, v.5, n.1, p.58–65, 2013.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Information Supplement CLSI document. Wayne, Pa: Clinical Laboratory Institute; 2019.

Croxen M.A. & Finlay B.B. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Natl Rev. Microbiol. 8:2638.

Croxen M.A. & Finlay B.B. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Natl Rev. Microbiol. 8:2638.

Decroo C., Colson E., Lemaire V., Caulier G., De Winter J., Cabrera-Barjas G., Cornil J., Flammang P., Gerbaux P. Ion mobility mass spectrometry of saponin ions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2018 doi: 10.1002/rcm.8193.

Derad I, Obermann B, Katalinic A, Eisemann N, Knobloch JKM, Sayk F, et al. Hypertension and mild chronic kidney disease persist following severe haemolytic uraemic syndrome caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 in adults. Nephrol Dial Transplant. 2016;31(1):95-103

Domitrovic R (2011) The molecular basis for the pharmacological activity of anthocyanins. Curr Med Chem, 18: 4454-69.

Donnenberg, M. S.; Whittam, T. S. Patogênese e evolução da virulência em *Escherichia coli* enteropatogênica e enterohemorrágica. The Journal of clinical investigation v. 107, n. 5, p. 539-548, 2001

Fagundes NU, Scaletsky ICA. The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. São Paulo Med J. 2000 Jan;118(1):21-9.

Filla, C. P. (2016). Principais conservantes utilizados em alimentos industrializados. Química alimentar. Consultado em 11 de fevereiro de 2020.

Goodman, L. S; Gilman, A. G. As bases farmacológicas da terapêutica. 1996. 9ª. Edição. Mc Graw Hill. pp 108-113.

Gyles C.L. & Fairbrother J.M. 2010. *Escherichia coli*, p.231-265. In: Gyles C.A., Prescott J.F., Songer J.G. & Thoen C.O. (Eds), Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Wiley-Blackwell, Iowa.

Iwai K, Kishimoto N, Kakino Y, Mochida Kand Fujita T. 2004. In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. J Agric Food Chem 52:4893–4898.

Jeong, K.W., Lee, J.Y., Kang, D.I., Lee, J.U., Shin, S.Y., Kim, Y. (2009). Screening of flavonoids as candidate antibiotics against *Enterococcus faecalis*. Journal of natural products 72, 719-24

Johnson, J.R.; Delavari, P.; Kuskowski, M.; Stell, A.L. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence associated traits in *Escherichia coli*. The Journal of Infectious Diseases, USA, v.183, p.78-88, 2001.

Kalinin V.I., Aminin D.L., Avilov S.A., Silchenko A.S., Stonik V.A. Triterpene glycosides from sea cucumbers (Holothuroidea, Echinodermata). Biological activities and functions. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 2008; 35:135–196.

Kanwal Q, Hussain I, LatifSiddiqui H, Javaid A (2010) Antifungal activity of flavonoids isolated from mango (*Mangifera indica* L.) leaves. Nat Prod Res, 24 (20): 1907-14.

Kindlein, L.; Lassen, P.; Ferreira, T.Z. Inspeção e Tecnologia de Produtos de Origem Animal com Enfoque em Concursos Públicos, Apostila, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 101p. 2014.

Knaak, N.; Fiuza, L.M. Potential of essential plant oils to control insects and microorganisms. *Neotropical Biology and Conservation*, n.2, p.120-132, 2010.

Knapp, S. *Solanum* section *Geminata* (Solanaceae). *Flora Neotropica*, v.84, p.1-404, 2002.

Laboratórios Belfar: <https://bula.medicinanet.com.br/bula/2787/ierobina.htm>

Lammie S.L.; Hughes JM. Antimicrobial resistance, food safety, and one health: the need for convergence. *Annual review Food Science and Technology*, v.7, p.287-312, 2016.

Latha P, S; Kannabiran P. Antimicrobial activity and phytochemicals of *Solanum trilobatum* Linn. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (23), pp. 2402-2404, 4 December 2006

Leeser, O. Solanaceae. 1962. *The British Homeopathic Journal*. (51): 149-166.

Lentz M.S. Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (83 p.) March, 2017.

Li Y, But pph and ooi vec. 2005. Antiviral activity and mode of action of caffeoylquinic acids from *Scheffera heptaphylla* (L.) Frodin. *Antiviral Res* 68: 1–9.

Lobô, K.M.S; Athayde, A.C.R; Silva, A.M.A; Rodrigues, F.F.G; LÔBO, I.S; Bezerra, D.A.C; Costa, J.G.M. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.12, n.2, p.227-233, 2010

Lopes, A.C.C.; Pinto, H.R.F.; Costa, D.C.I.O.; Mascarenhas, R.J.; Aquino, J.S. Avaliação das Boas Práticas em unidades de alimentação e nutrição de escolas públicas do município de Bayeux, PB, Brasil, RESUMO, Universidade Federal da Paraíba, 2014.

Macedo, K. H. et al *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 41, n. 2, p. 263-272, jul./dez. 2020

Mainil J. 2013. *Escherichia coli* virulence factors. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 152:2-12.

Mainil J.G. & Daube G. 2005. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? J. Appl. Microbiol. 98:1332-1344.

Malacrida, A. M., Dias, V. H. C. & Lima, C. L. 2017. Perfil epidemiológico das doenças bacterianas transmitidas por alimentos no Brasil. II Simpósio de Produção Sustentável e Saúde Animal, Umuarama, Paraná.

MATIAS, L. J. et al. Structure and histochemistry of medicinal species of *Solanum*. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 26, n. 2, p. 147-160, 2016.

Mello, J. P. C.; Santos, S. C. Em Farmacognosia: da planta ao medicamento; Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P., orgs.; Ed. UFSC: Porto Alegre; 3ª ed., 2001.

Million, L; J. Estudo etnobotânico na comunidade de taquara: a luta pelo uso de plantas nativas pelo povo kaioiwá, ms, brasil julho, 2017

Mishima S, Yoshida C, Akino S and S Akamoto T. 2005. Antihypertensive effects of brazilian propolis: Identification of caffeoylquinic acids as constituents involved in the hypotension in spontaneously hypertensive rats. Biol Pharm Bull 28: 1909–1914.

Mitu S.A., Bose U., Suwansa-ard S., Turner L.H., Zhao M., Elizur A., Ogbourne S.M., Shaw P.N., Cummins S.F. Evidence for a saponin biosynthesis pathway in the body wall of the commercially significant sea cucumber *Holothuria scabra*. Mar. Drugs. 2017; 15:349. doi: 10.3390/md15110349.

Mohammed, M. A. Sallam, K. I.; Eldaly, E. A. Z.; Ahdy, A. M.; Tamura, T. Occurrence, serotypes and virulence genes of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fresh beef, ground beef, and beef burger. Food control, v. 37, p. 182-187, 2014.

Nicholson, R. L.; Hammerschmidt, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. Annual Reviews of Phytopathology, v. 30, p. 369-389, 1992

Nunes, S. M., Cergole-Novella, M. C., Tiba, M. R., Zanon, C. A., Bento, I. S. S., Paschualinoto, A. L., Thomaz, I., Silva, A. A. & Walendy, C. H. 2017. Surto de doença transmitida por alimentos nos municípios de Mauá e Ribeirão Pires – SP. Higiene Alimentar, 32, 97-102.

Ochoa TJ, Contreras CA. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. Curr Opin Infect Dis. 2011 Oct;24(5):478-3.

Panò, Stefania. Mechanisms of Salmonella Typhi Host Restriction. Biophysics Of Infection, [s.l.], p.283-294, 2016.q6q22

Park JS, Kim IS, Shaheed Ur Rehman, Na CS, Yoo HH. 2016. HPLC Determination of Bioactive Flavonoids in Hovenia dulcis Fruit Extracts. J Chromatogr Sci. 54 (2): 130- 5. doi: 10.1093/chromsci/bmv114.

Pereira, A.C., Oliveira, D.F., Silva, G.H., Figueiredo, H.C.P., Cavaleiro, A.J., Carvalho, D.A., Souza, L.P., Chalfoun, S.M., 2008. Identification of the antimicrobial substances produced by *Solanum palinacanthum* (Solanaceae). An. Acad. Bras. Cienc. 80, 427-432

Petrosyan, M.; Shcherbakova, Y.; Sahakyan, N.; Vardanyan, Z.; Poladyan, A.; Popov, Y. *Alkanna orientalis* (L.) Boiss. Culturas isoladas de plantas e atividade antimicrobiana de seus extratos: fenômeno, dependência de diferentes fatores e efeitos em algumas propriedades bacterianas associadas à membrana. Culto ao órgão de tecidos de células vegetais, v.122, p.727–38, 2015.

Preethi, K.; Premasudha, P.; Keerthana, K. Anti-inflammatory activity of Muntingia calabura fruits. Pharmacognosy Journal, v. 4, n.30, p. 51-56, 2012.

Ribeiro, S.R., Fortes, C.C., Oliveira, S.C.C., Castro, C.F.S., 2007. Avaliação da atividade antioxidante de *Solanum paniculatum* (Solanaceae). A. Cien. S. Univ. Paran. 11, 179-183.

Ribeiro-Santos, Regiane et al. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. Trends in food science & technology, v. 61, p. 132-140, 2017.

Saad, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

Satué M, Arriero MM, Monjo M, Ramis JM (2013) Quercitrin and taxifolin stimulate osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells and inhibit osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells. Biochemical pharmacology, 86: 1476-86.

Silva, M. M., & Lidon, F. C. (2016). Food preservatives – An overview on applications and side effects. *Emirates journal of food and agriculture*, 28(6), 366 – 373.

Souza, C.P. Segurança Alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimento. *Revista APS*, v.9, n.1 p.83-88, jan./jun.2006.

Upadhyay, A.; Upadhyaya, I.; Kollanoor-johny, A.; Venkitanarayanan, K. Combate a microorganismos patogênicos usando antimicrobianos derivados de plantas: uma revisão minuciosa da base mecanicista. *Biomed Res Int.*, v.18, 2014.

Valentini, C.M.A.; Almeida, J.D.; Coelho, M.F.B.; Rodriguez-Ortiz, C.E. Fenologia da *Siparuna guianensis* Aublet em dois bosques de preservação ambiental em Cuiabá-MT. *Cerne*, n. 4, p. 581-591, 2013.

Violante, I.M.P.; Souza, I.M.; Venturini, C.L.; Ramalho, A.F.S.; Santos, R.A.N.; Ferrari, M. Estudo preliminar da atividade fotoprotetora *in vitro* de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. *Revista Brasileira de Farmacologia* v.89, p.175-179, 2008.

Wang YJ, Zhang HQ, Han HL, Zou YY, Gao QL, Yang GT (2017) Taxifolin enhances osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells partially via NF- κ B pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 490: 36-43.

Werlem F.S; Nágilla D.F; Santos E.A; Santos L.A; MARTINS; A.O; RAGHIANTE F. doi: DOI: 10.36229/978-85-7042-146-3.CAP.08 Identificação de *Escherichia coli* em queijos tipo minas artesanal e perfil de susceptibilidade antimicrobiana-Ciência e Tecnologia dos Alimentos - Volume 3 capítulos 3 pag 41 á 48

World Health Organization (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations & Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting (80th: 2015, Rome, Italy). Evaluation of certain food additives and contaminants: eightieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 109 p.

World Health Organization (WHO), United Nations Children's Fund (UNICEF). Progress on drinking water, sanitation and hygiene: 2017. [cited 2019 Jan 25]. Disponível em: [https:// www.unicef.org/publications/index_96611. html#](https://www.unicef.org/publications/index_96611.html#)

Yun S.-H., Sim E.-H., Han S.-H., Han J.-Y., Kim S.-H., Silchenko A.S., Stonik V.A., Park J.-I. Holotoxin A₁ induces apoptosis by activating acid sphingomyelinase and neutral sphingomyelinase in K562 and human primary leukemia cells. *Mar. Drugs*. 2018; 16:123. doi: 10.3390/md16040123.

Zhang J.-J., Zhu K.-Q. A novel antitumor compound nobiliside D isolated from sea cucumber (*Holothuria nobilis* Selenka) *Exp. Ther. Med.* 2017; 14:1653–1658. doi: 10.3892/etm.2017.4656.

Zhao Y.-C., Xue C.-H., Zhang T.-T., Wang Y.-M. Saponins from sea cucumber and their biological activities. *J. Agric. Food Chem.* 2018; 66:7222–7237. doi: 10.1021/acs.jafc.8b01770.

Zhux, Zhanghandlor. 2004. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. *J Agric Food Chem* 52:7272–7278.

CAPITULO 3 ARTIGO CIENTIFICO

Efeito Antimicrobiano do Extrato Etanólico de *Solanum Palinacanthum* e *Siparuna Guianensis* em *Escherichia coli* Multirresistentes Isoladas de Alimentos

*Larissa Alves Oliveira ^{1,2}, Cecília Nunes Moreira ²

¹Programa de pós graduação em Biociência animal. Departamento de Pós Graduação em Biociência animal, Universidade Federal de Jataí, Campus Jataí, Rodovia BR 364, Km 192, caixa postal 03, CEP 75801-615 Jataí – GO. Autor para correspondência: lariissaalvesoliveira@gmail.com

RESUMO

[Efeito Antibacteriano do Extrato de *Solanum Palinacanthum* e *Siparuna Guianensis* em *Escherichia coli* isoladas de alimentos] Objetivou-se avaliar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Escherichia coli* resistentes e multirresistentes isoladas de diferentes alimentos frente aos extratos etanolicos de duas plantas do cerrado, *Solanum palinacanthum* (nome popular jóa) e *Siparuna guianensis* (nome popular negramina) através da disco difusão e microdiluição e comparar com o perfil de suceptibilidade a antimicrobianos convencionais, assim comoverificada a ocorrência de patotipos diarreiogênicos de *E. coli* (*E. coli* entoropatógênica/EPEC, *E. coli* enterotoxigênica/ETEC, *E. coli* produtora de shiga toxina/STEC), e identificados os grupos filogenéticos destas cepas isoladas de diversas matrizes alimentícias as quais estavam destinadas ao consumo humano, comercializadas no município de Rio Verde e Jataí, Goiás, Brasil. O perfil de susceptibilidade antimicrobiana das amostras de *E. coli* foi avaliado por meio da técnica disco difusão, utilizando 18 antimicrobianos convencionais e os isolados que se apresentaram resistentes ou multirresistentes foram testados para os extratos etanolicos de *Solanum palinacanthum* e *Siparuna guianenses* e avaliados através da disco difusão, relacionando os patotipos de *E. coli* diarreiogênica assim como a filogenia pela técnica de PCR convencional. Dentre as 150 amostras de *E. coli* analisadas 100% (150/150) de cepas apresentaram-se multirresistentes. Os fármacos fosfomicina e colistina foram os mais eficazes com 100% e 95,23% respectivamente, diferentemente da penicilina e tiomicosin, que apresentaram o maior percentual de resistência com 100% e 95,12%, respectivamente. Essas amostras foram testadas para os extratos etanólicos das duas plantas, porém não apresentaram potencial de inibição da *E. coli*. Não foram identificados os patotipos de EPEC, STEC, EIEC entre os isolados testados e das 150 amostras analisadas foram classificados para o filo grupo B1 correspondendo a 62% (94/150) do total das amostras analisadas, seguido dos isolados pertencentes aos grupos filogenéticos A ou C, correspondendo a 27% (27/150) do total, do Clado I ou II com 3% (4/150) do total, grupo filogenéticoB2 sendo o menos frequente 1% (1/150) do total, grupos filogenéticos D ou E, com 6% (9/150) do total, e o grupo filogenético F , com 4% (6/150) do total. 6% (9/150) das amostras analisadas foram classificadas como grupo indeterminado (U). Conclui-se que os extratos etanolicos das plantas *Solanum palinacanthum* e *Siparuna guianenses* não apresentaram efeito antimicrobiano entre as amostras de *E. coli* multirresistentes, isoladas de alimentos destinados ao consumo humano em Rio Verde e Jataí, e que existem amostras multirresistentes e pertencentes a grupos filogenéticos potencialmente patogênicos o que é um agravo para a saúde pública.

Palavras chave: filogenia, STEC, EPEC, EHEC, multidroga resistente.

¹ Rua RC 02 quadra 8 lote 25 residencial cannã – Rio Verde Goiás. lariissaalvesoliveira@gmail.com

ABSTRACT

[Antibacterial Effect of Solanum Palinacanthum Extract and Siparuna Guianensis on *Escherichia coli* isolated from foods] The aim of this study was to evaluate the antimicrobial susceptibility profile of resistant and multiresistant *Escherichia coli* isolated from different foods against ethanol extracts from two cerrado plants, Solanum palinacanthum (popular name jóa) and Siparuna guianensis (popular name negramina) through disk diffusion and microdilution and compare with the susceptibility profile to conventional antimicrobials, as well as verified the occurrence of diarrheagenic *E. coli* pathotypes (enteropathogenic *E. coli*/EPEC, *E. enterotoxigenic coli*/ETEC, *E. coli* producing shiga toxin/STEC), and identified the phylogenetic groups of these strains isolated from different food matrices which were intended for human consumption, commercialized in the cities of Rio Verde and Jataí, Goiás, Brazil. The antimicrobial susceptibility profile of *E. coli* samples was evaluated using the disk diffusion technique, using 18 conventional antimicrobials, and the isolates that were resistant or multiresistant were tested for ethanol extracts of Solanum palinacanthum and Siparuna from Guyana and evaluated using the disk diffusion, relating the diarrheagenic *E. coli* pathotypes as well as the phylogeny by the conventional PCR technique. Among the 150 *E. coli* samples analyzed, 100% (150/150) of strains were multiresistant. The drugs fosfomycin and colistin were the most effective with 100% and 95.23% respectively, unlike penicillin and thiomycin, which showed the highest percentage of resistance with 100% and 95.12%, respectively. These samples were tested for the ethanol extracts of the two plants, but they did not show any potential to inhibit *E. coli*. Pathotypes of EPEC, STEC, EIEC were not identified among the tested isolates and of the 150 analyzed samples were classified for the group B1 phylum corresponding to 62% (94/150) of the total of the analyzed samples, followed by the isolates belonging to the phylogenetic groups A or C, corresponding to 27% (27/150) of the total, of Clade I or II with 3% (4/150) of the total, phylogenetic group B2 being the least frequent 1% (1/150) of the total, phylogenetic groups D or E, with 6% (9/150) of the total, and the phylogenetic group F, with 4% (6/150) of the total. 6% (9/150) of the analyzed samples were classified as an indeterminate group (U). It is concluded that the ethanol extracts of Solanum palinacanthum and Siparuna from Guyana had no antimicrobial effect among samples of multiresistant *E. coli* isolated from foods for human consumption in Rio Verde and Jataí, and that there are multiresistant samples belonging to phylogenetic groups potentially pathogenic, which is a problem for public health.

Keywords: phylogeny, STEC, EPEC, EHEC, resistant multidrug.

INTRODUÇÃO

Escherichia coli é um dos contaminantes microbiológicos comumente isolados em alimentos e é caracterizado como um dos principais parâmetros para avaliação da qualidade sanitária, onde também é utilizado como indicador sanitário. *E. coli* atuam ainda, como microrganismos indicadores para o monitoramento da disseminação da resistência aos antimicrobianos e, também, como potencial causadora de Doenças veiculadas por alimentos (DVA), por meio de seus patótipos diarreio gênicos, entre eles *E. coli* enteropatogênica/ EPEC; *E. coli* produtora de toxina de shiga/STEC; *E. coli* enterohemorrágica/EHEC e aos diferentes filogrupos patogênicos (Faula et al., 2017)

O monitoramento da resistência antimicrobiana em *E. coli*, é importante pois possui uma ampla disseminação no ambiente (solo, água e alimentos) e em diversos hospedeiros, tem grande facilidade de transferência de genes de resistência inter e intra espécie e é uma bactéria com uma gigantesca relevância no que diz respeito Saúde Pública (ECDC, 2016).

A *E. coli*, é um patógeno de origem alimentar, embora a maioria comensal, existem grupos patogênicos diarreio gênicos as quais são responsáveis por inúmeros surtos a nível mundial, onde o quadro clínico principal é a presença de diarreia nas diarreio gênicas (Ronald, 2001; CDC, 2016).

Nos EUA, em 1998 e 2014, foram investigados 18.211 surtos de DTA, 2,9% deles ocasionados por *E. coli* diarreio gênica (CDC, 2016). Enquanto que no Brasil nos anos de 2000 a 2013, foram notificados 8.857 surtos de DTA. Entretanto, não há estatística oficial que associe a presença de *E. coli* diarreio gênica com estes eventos, em grande parte devido à dificuldade na detecção dos patótipos, apontando uma fragilidade do Sistema Nacional de Vigilância em Saúde (Ritter e Tongo, 2014). Entretanto os dados oficiais que associe a presença de *E. coli* diarreio gênica a esses surtos, são imprecisos e essa causa se atribui em grande parte, as limitações no diagnóstico em relação aos patótipos e filogenia, o que evidencia uma vulnerabilidade do Sistema Nacional de Vigilância em Saúde (Faula et al., 2017).

A filogenia de *E. coli* sugere uma evolução de cepas comensais de *E. coli* que eram originalmente desprovidas de fatores de virulência, mas se tornaram patogênicas por causa de transferências gênicas horizontais envolvendo eventos de transdução, transformação e conjugação dessas transferência pode se dá entre ExPEC e isolados diarreio gênicos e em outras espécies (Lo et al., 2015). Devido isso os antimicrobianos representam um dos maiores avanços da ciência moderna e é usado até os tempos atuais, para combater as bactérias, entretanto o uso indiscriminado somado a pressão evolutiva que os microorganismos vem passando desencadeou o surgimento de resistência dos microrganismos, o que vem aumentando em vários antimicrobianos testados, mesmo aqueles que não são utilizados rotineiramente pelo homem, porém utilizados na terapêutica médica veterinária (Tamma & Simner, 2018).

Pensando nisso alternativas devem ser desenvolvidas e os recursos naturais utilizado na terapia popular vem sendo explorado, os metabólitos secundários das *Siparuna guianenses* e *Solanum palinacantum* são responsáveis por sua ação antimicrobiana entre outras ações terapêuticas (Chung et al., 2011). Os principais grupos de fitoquímicos que tem essas propriedades antimicrobianas são os fenólicos e polifenóis (flavonóides, quinonas, taninos, cumarinas), terpenóides, alcaloides, lectinas e polipeptídeos (Rajeh et al., 2013).

Levando em conta a importância de se monitorar a resistência antimicrobiana e a ocorrência de *E. coli* diarreio gênica em alimentos, bem como considerar alternativas para o controle da resistência bacteriana a antimicrobianos, o presente estudo avaliou o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *E. coli* de alimentos a antimicrobianos convencionais e testou como medida alternativa o efeito antimicrobiano de dois extratos naturais o da *Siparuna guianenses* e o da *Solanum palinacantum* entre os isolados que se apresentaram multiresistentes e relacionou-se aos grupos filogenéticos e patótipos diarreio genicos que pertenceram após a PCR.

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Delineamento experimental

Foram utilizadas, neste estudo, 150 cepas bacterianas de *E. coli* isoladas de diversos alimentos em pesquisas realizadas entre os anos de 2013 a 2019 e que pertencem à bacterioteca da Universidade Federal de Jataí-GO (UFJ). Das quais 41 foram isoladas de carne de frango (Silva et al., 2020), 41 de carne moída, 21 de carne suína (Barbosa et al., 2020), 26 de alface (Arrais et al., 2020) e 21 de queijo tipo minas frescal (Barbosa et al., 2020).

3.1.2 Recuperação microbiológica das cepas

As cepas de *E. coli* que se encontravam estocadas em freezer -20°C foram inoculadas em caldo Mueller Hilton, incubadas em estufa bacteriológica, em aerobiose, por 18 a 24 horas, à 37°C. Após recuperação das mesmas, foi confirmada através de meio cromogênio harlequin onde placas com coloração roxa são positivas para *E. coli* (figura 4). Após confirmação foi inoculado uma colônia em tubos contendo ágar nutriente fosfatado, devidamente identificado e, a cada 30 dias, as amostras eram repassadas para um novo ágar para armazenamento. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente, para realização dos testes subsequentes onde foram confirmadas. Todas as recuperações microbiológicas foram seguidas de cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 (CLSI 2019), para controle positivo e *Staphylococcus hycus* ATCC para controle negativo.

Figura 4: Meio cromogenico Harlequin positivo para *E. coli*.



FIG 04: Meio de cultivo harlequin contendo colônias de *E. coli* as colônias apresentam característica roxa

3.1.3 Obtenção do material botânico e identificação das espécies

O material botânico das plantas nativas do cerrado *Solanum palinacanthum* (nome popular jóa) e *Siparuna guianensis* (nome popular negramina) foram obtidos no município de Jataí, Goiás, Brasil, que está situado na região sudoeste do estado de Goiás (GO) Latitude: -17.8759, Longitude: -51.7214 17° 52' 33" Sul, 51° 43' 17" Oeste. Foram utilizados galhos contendo folhas verdes, livres de patógenos, sendo a identificação botânica das espécies foi realizada visualmente, acompanhada de material literário pelo Departamento de Biologia Botânica da Universidade Federal de Jataí.

Figura 5: *Solanum palinacanthum*



FIG 05: Folhas, caule, flores e frutos da planta *Solanum palinacanthum*.

Figura 6: *Siparuna guianensis*



FIG 06: Folhas, caule e frutos da planta *Siparuna guianensis*.

3.1.4 Obtenção dos extratos das plantas

Os extratos foram obtidos no Laboratório de Química orgânica e inorgânica da UFJ (figura 8). Primeiramente, folhas saudáveis foram separadas, posteriormente lavadas em água corrente e acondicionadas em bandejas plásticas para secagem em temperatura ambiente e local ventilado por sete dias.

Após a secagem, foi realizada a trituração das folhas secas em liquidificador para obtenção de um pó. Em seguida, este material foi submetido ao processo de extração, com o uso do diluente etanol. A mistura foi deixada em temperatura ambiente, com agitação por pelo menos 12h. Foram realizadas três extrações consecutivas do mesmo pó, para retirada do máximo possível de compostos biológicos ativos.

Após a extração, foi realizada a filtragem do material utilizando-se funil e papel filtro, além de uma bomba a vácuo, para retirada da parte sólida, restando apenas a parte líquida, extrato bruto etanólico. O extrato bruto etanólico foi submetido ao rotaevaporador, para evaporação do solvente à temperatura de 55 °C, permanecendo somente o extrato bruto.

O extrato bruto foi pesado e acondicionado em recipientes de vidros, devidamente identificados e acondicionados. O material foi deixado na capela de exaustão objetivando a completa eliminação do etanol e, após três pesagens consecutivas, em dias alternados, o processo foi concluído e o extrato armazenado em freezer a -80°C para posteriores análises. A metodologia de obtenção dos extratos das plantas desta pesquisa foi descrita por Carvalho et al., 2020.

2.3 Teste de sensibilidade por disco de difusão

As cepas de *E. coli* e *Salmonella* spp, previamente recuperadas serão testadas quanto à susceptibilidade, frente a 18 antimicrobianos difundido em ágar Mueller-Hinton (Oxoid Ltd. Hampshire, Reino Unido) pelo método de disco difusão (CLSI, 2019). Uma suspensão bacteriana será ajustada a 0,5 MCFarland com a turbidez ajustada. Serão utilizados os seguintes antimicrobianos: Gentamicina (CN; 10µg), Tilmicosin (TIL; 15 µg), Ácido Amoxicilina-Clavulânico (AMC; 20µg), Ampicilina (AMP; 10 µg), Norfloxaxina (NOR; 10 µg), Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT; 25 µg), Ciprofloxacina (CIP; 5 µg), Ceftiofur (EFX; 30µg), Fosfomicina (FOS; 50 µg), Enrofloxaxina (ENR; 05µg), Neomicina (N; 30 µg), Oxitetraciclina (OX; 30 µg), Docixiclina (DOX; 30 µg), Linco Spectin (LS; 109µg), Florfenicol (FL; 30 µg), Colistina (CL; 10 µg), Tetraciclina (TRA; 30 µg) e Penicilina (P; 30µg). Após incubação à 35 °C, por 18 a 24 h as zonas de inibição serão medidas e classificadas como sensíveis, suscetíveis e resistentes, de acordo com as diretrizes CLSI 2019. Os isolados serão classificados como multiresistentes quando apresentarem resistência a mais de 3 grupos de farmacos avaliados (Magiorakos et al., 2012).

Figura 7: Halo de inibição da *E.col* frente as dogas convencionais.

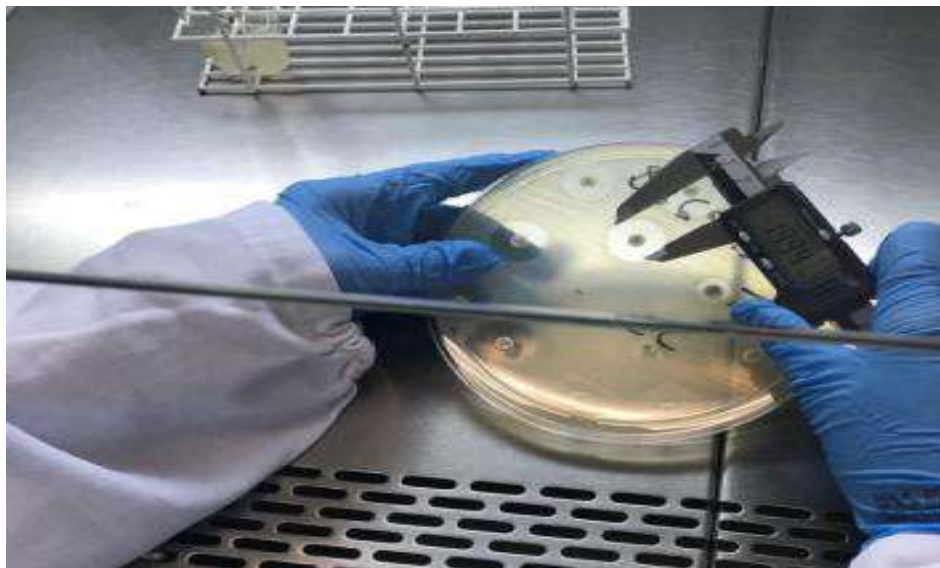


FIG 7: Leitura do halo de inibição bacteriana.

Figura 8: Fases do processo de extração com etanol.



FIG 8: A – Folhas secas de *Solanum palinacanthum*, B – Trituração no liquidificador, C – Material em pó da trituração, D – Extração etanólica do pó através de um agitador magnético com aquecimento.

3.1.6 Teste de disco difusão dos extratos brutos de *Solanum palinacanthum* e *Siparuna guianensis*

Para as cepas bacterianas que apresentaram resistência ou multirresistência aos antibacterianos testados, foram testadas em triplicata, através do método de disco difusão em papel de filtro, através da adaptação do método de Kirby-Bauer, para os extratos brutos de *Solanum palinacanthum* e *Siparuna guianensis* (Nardeli et al. 2014). As concentrações foram preparadas a partir do extrato bruto a 50% (500 μL /mL) e diluídas a 10% (100 μL /mL), 5% (50 μL /mL), 2,5% (25 μL /mL), 1% (10 μL /mL) e 0,1% (1 μL /mL) (Haida et al 2007) (figura 9). Foram utilizados discos de 6 mm de diâmetro, embebidos com 10 μL de cada extrato em estudo e, como controles negativos, os solventes e água destilada; como controle positivo, fosfomicina (30 μg) para bactérias Gram negativas. Em placas de Petri, contendo meio de cultura Mueller-Hinton, foram semeadas o caldo turvado da bactéria ajustada a 0,5 MCFarland e em sequência foram acrescentados os discos com extratos e os controles.

Após 24 horas de incubação em estufa a $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, foi realizada a leitura dos resultados, que consistiu na medição do diâmetro dos halos de inibição, incluindo o próprio disco. Considerou-se como resultado final a média das três medidas, expressas em termos do diâmetro (mm) da zona de inibição do crescimento bacteriano (Azevedo 2014, Guimarães et al. 2010). Os resultados foram expressos em termos do diâmetro (mm) da zona de inibição do crescimento bacteriano (figura 10).

Figura 9: Tubos de diluições dos extratos e controles de diluição bacteriana.

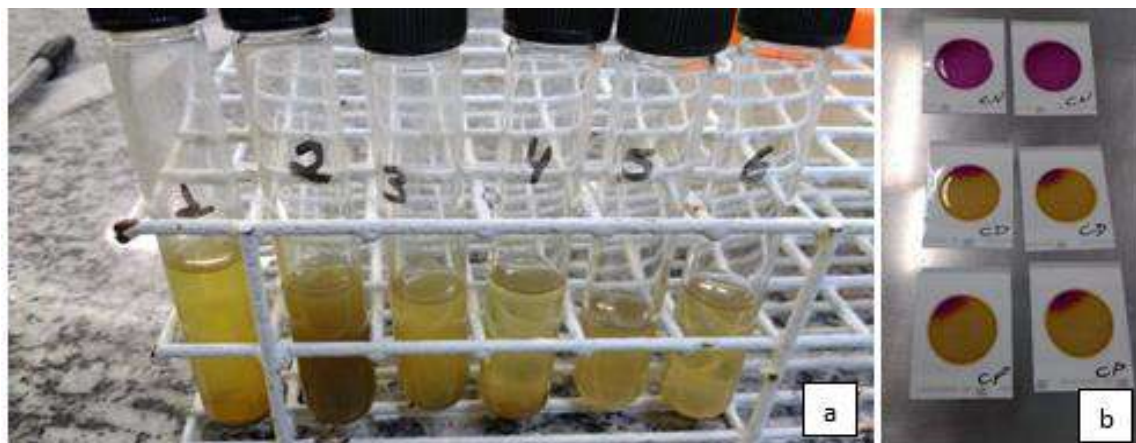


FIG 09: A) Tubos com as concentrações preparadas a partir do extrato bruto a 50% (500 mg/ mL) (tubo 1) e diluídas a 10% (100 mg/mL) (tubo 2), 5% (50 mg/mL) (tubo 3), 2,5% (25 mg/mL) (tubo 4), 1% (10 mg/mL) (tubo 5) e 0,1% (1 mg/ mL) (tubo 6). B). Inoculação dos controles negativo (CN), positivo (CP) e da diluição (CD).

Figura 10: Placa de petri com disco difusão dos extratos

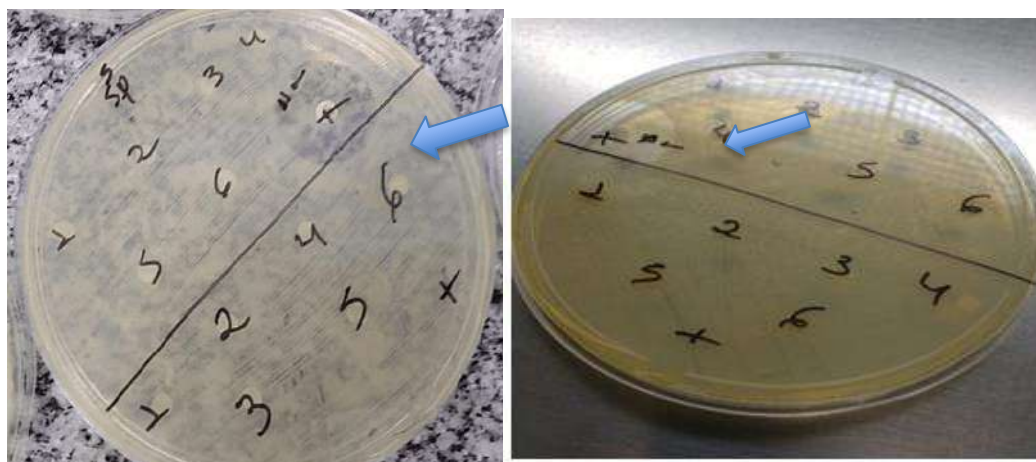


FIG 10: Na metade superior os discos com as 6 concentrações de *Siparuna guianensis* e na metade inferior os 6 discos embebidos com *Solanum palinacanthum*. A seta azul indica o controle positivo – fosfomicina. 1 = 50%; 2 = 10%; 3 = 5%; 4 = 2,5%; 5 = 1% e 6 = 0,1%.

3.1.6 Teste de diluição em caldo (microdiluição) dos extratos brutos de *Solanum palinacanthum* e *Siparuna guianensis*

A metodologia aplicada nessa microdiluição se baseou no comunicado técnico de Santos Filho (2019), com modificações. As cepas que apresentaram resistência e multirresistência foram testadas através da técnica de microdiluição em placas de 96 poços, contendo caldo BHI e extrato etanólico de *Solanum palinacanthum* e *Siparuna guianensis* que foram diluídos em água destilada, previamente autoclavada em frasco âmbar, obtendo a concentração de 10 mg/mL, como na metodologia de Santos Filho (2019). Para a inoculação bacteriana na placa, foi ajustada em solução salina (NaCl 0,85%) na escala de 0,5 MacFarland. Foi aplicado 200 μL do extrato (10 mg/mL) na linha A, depois foi depositado 100 μL do caldo BHI da coluna 1 a A B30 12 e da linha B até H, posteriormente foram feitas as diluições seriadas pegando 100 μL do primeiro poço e passando para o seguintes poços, da linha A até a F e no poço F após realizar a homogeneização foram descartados os 100 μL , obtendo as seguintes diluições 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2,5mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL, 0,313 mg/mL, após feitas as

diluições foram adicionados 10 µL da solução bacteriana em triplicata, da linha A até G, ou seja, em cada placa foram aplicadas quatro cepas de diferentes alimentos (Figura 11). Para validação do teste de microdiluição na linha G foi considerado o controle positivo tendo crescimento bacteriano, contendo caldo BHI e o inoculo bacteriano da cepa testada, já na linha H foi considerado como controle negativo, contendo apenas o caldo BHI, não tendo inoculo bacteriano e nem o extrato de *S. palinacanthum*, conforme exemplificado.

Figura 11: Microdiluição do Extrato de *Solano palinacanthum* e *Siparuna guianenses* com cepas de *Escherichia coli*.

	Inoculo 1			Inoculo 2			Inoculo 3			Inoculo 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10 mg/mL	Quadrado azul (Extrato + Inoculo)											
5 mg/mL												
2,5 mg/mL												
1,25mg/mL												
0,625 mg/mL												
0,313 mg/mL												
Controle +	Quadrado vermelho (Controle positivo, contendo BHI + Inoculo)											
Controle -												

FIG 11: Legenda: Quadrado azul (Extrato + Inoculo), Quadrado amarelo (Caldo BHI+Extrato em diferentes diluições+Inoculo bacteriano), Quadrado vermelho (Controle positivo, contendo BHI + Inoculo), Quadrado preto (controle negativo, contendo apenas caldo BHI)

3.1.7. Análises de PCR

Todas as 150 cepas de *E. coli* tiveram seu DNA extraído pelo método da fervura, segundo Olsvick & Strockbine (1993). O DNA foi transferido para tubo eppendorf 0,5 mL, livre de Dnase e Rnase, previamente esterilizado e mantido à -20 °C até o momento das análises.

a. Classificação filogenética

A determinação do grupo filogenético foi realizada por meio de ensaios de amplificação simultânea (PCR-quadruplex), visando a detecção sequencial de DNA de determinados genes, conforme descrito por Clermont et al. (2013) (Quadro 1). As reações foram realizadas com volume final de 20 µL, contendo Tampão de PCR 1x, 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 2 unidades de Taq DNA polimerase, 3 µL de DNA e os primers apropriados. Foram utilizados 0,2 µM, de cada um dos primers, exceto para AceK.f, cuja concentração na reação foi de 0,4 µM. Todas as reações foram realizadas no termociclador Veriti (Applied Biosystems) programado para desnaturação inicial a 94 °C (4 minutos), seguida de 30 ciclos de 94 °C (5 segundos), 57°C (grupo E) ou 59 °C (quadruplex e grupo C) (20 segundos) 72 °C (10 segundos). Após os ciclos, foi realizada a extensão final a 72 °C (5 minutos).

Quadro 1. Primers utilizados na PCR para classificação filogenética das cepas de *Escherichia coli* isoladas de alimentos

Primer		Código do gene	Sequência do primer	Amplificação (bp)	Referência
Quadruplex	<i>chuA.1b</i>	<i>chuA</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288	Clermont et al. (2013)
	<i>chuA.2</i>		TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
	<i>yjaA.1b</i>	<i>yjaA</i>	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	211	Clermont et al. (2013)
	<i>yjaA.2b</i>		AATGCGTTCTCAACCTGTG		
	<i>TspE4C2.1b</i>	<i>TspE4.C2</i>	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152	Clermont et al. (2013)
	<i>TspE4C2.2b</i>		AGTTTATCGCTGCGGGTCGC		
	<i>AceKf</i>	<i>arpa</i>	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400	Clermont et al. (2013)
	<i>ArpA1.r</i>		TCTCCCCATACCGTACGCTA		
	<i>trpBA.r</i>		GCAACGCGGCCTGGCGGAAG		

Os produtos amplificados por PCR foram detectados por eletroforese em gel de agarose (BioAmerica Biotech®) a 2,0%, utilizando-se como tampão o Tris/Borato/EDTA - TBE 1X (0,89 M Tris; 0,02M EDTA; 0,89 M ácido bórico). A separação eletroforética foi realizada a 4 Volts/cm por um período de aproximadamente 1 hora. Após eletroforese, os géis foram corados em solução de brometo de etídio 0,5 mg/mL e visualizados em transiluminador ultravioleta. As imagens dos géis foram feitas com foto documentador com sistema de documentação Gel Doc-Print VX2. Foram considerados como gene *arpA* fragmentos com peso molecular de 400 pb; *chuA* fragmentos de 288 pb; *yjaA* fragmentos de 211 pb e *TspE4C2* fragmentos de 152 pb.

b. Caracterização dos patótipos de *Escherichia coli* diarreioigenica

As amostras de DNA obtidas a partir dos 150 isolados de *E. coli* foram agrupadas na forma de *pools*, de no máximo 5 amostras de *E. coli*, para a caracterização dos grupos STEC, EHEC e EPEC.

Os pools de amostras de DNA foram amplificados, permitindo a identificação dos fatores de virulência *stx1*, *stx2* e *eaeA*. Sendo realizadas duas PCRs distintas, uma para triplex objetivando a identificação de *stx1*, *stx2* e E16S (utilizado como controle interno para *E. coli*) e a segunda para a identificação do *eaeA*. As sequências dos primers utilizados encontra-se descritas no Quadro 02.

A PCR triplex foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 10,7 µL água ultrapura livre de nucleases, 1x tampão de PCR, 3mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 µM de cada um dos primer *stx1.F*, *stx1.R*, *stx2.F* e *stx2.R*, 0,1µM dos primers E16S.F e E16S.R, 1,5 unidades de *Taq* DNA Polimerase (Ludwig Biotec) e 3 µL de DNA. A amplificação foi realizada em um termociclador Veriti (Applied Biosystems) com desnaturação inicial a 95° C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos a 95° C por 1 minuto, 60° C por 1:30 minutos e 72° C por 1:30 minutos, e extensão final a 72° C por 7 minutos.

Para PCR do gene *eaeA*, foi usada um volume final de 20 µL, contendo água ultrapura 10,8 µL, tampão de PCR, 2mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,3 µM de cada um dos primers *eaeA200.F* e *eaeA200.R*, 1 unidade de *Taq* DNA Polimerase (Ludwig Biotec) e 3 µL de DNA.

A amplificação do DNA foi realizada em um termociclador Veriti (Applied Biosystems) com desnaturação inicial 95° C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 95° C por 30 segundos, 55° C por 30 segundos e 72° C por 30 segundos, e extensão final a 72° C por 7 minutos.

* *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Fonte: OH et al., (2014) com modificações.

Os produtos amplificados por PCR foram detectados por eletroforese em gel de agarose (BioAmerica Biotech®) a 2%, utilizando-se como tampão o Tris/Borato/EDTA - TBE 1X (0,89 M Tris; 0,02M EDTA; 0,89 M ácido bórico) e comparados com padrão de peso molecular 100 bp Ladder plus (Sinapse Inc.). A separação eletroforética foi realizada a 4 V/cm durante aproximadamente 40 minutos. Os géis foram corados em solução de brometo de etídio 0,5 mg/mL e visualizados em transiluminador ultravioleta. As imagens dos géis foram feitas com transiluminador e fotodocumentador com sistema de documentação Gel Doc-Print VX2

Quadro 2: Sequência gênica dos primers utilizados para caracterizar os patótipos diarreio gênicos de *Escherichia coli*.

Patótipo	Nome do gene	Nome do primer	Sequência	Pb
EHEC -STEC	<i>Stx2</i>	stx2.F	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255
		stx2.R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	
	<i>Stx1</i>	stx1.a	TCTCAGTGGGCGTTCTTATG	338
		stx1.b	TACCCCTCAACTGCTAATA	
EHEC-EPEC	<i>eaeA</i>	eaeA 220F	CGGCGATTACGCGAAAGA	248
		eaeA 220R	CCTAAATTTGCCGTAAAG GG	
<i>E.coli</i> 16S		E16S.a	CCCCCTGCACGAAGACTGAC	400
		E16S.b	ACCGCTGGCAACAAAGGATA	

3.1.8 Análises de dados

Os dados do isolamento microbiológico, antibiograma e caracterização molecular das cepas de *E. coli* foram apresentados na forma de porcentagem.

3.1.9 Comitê de ética

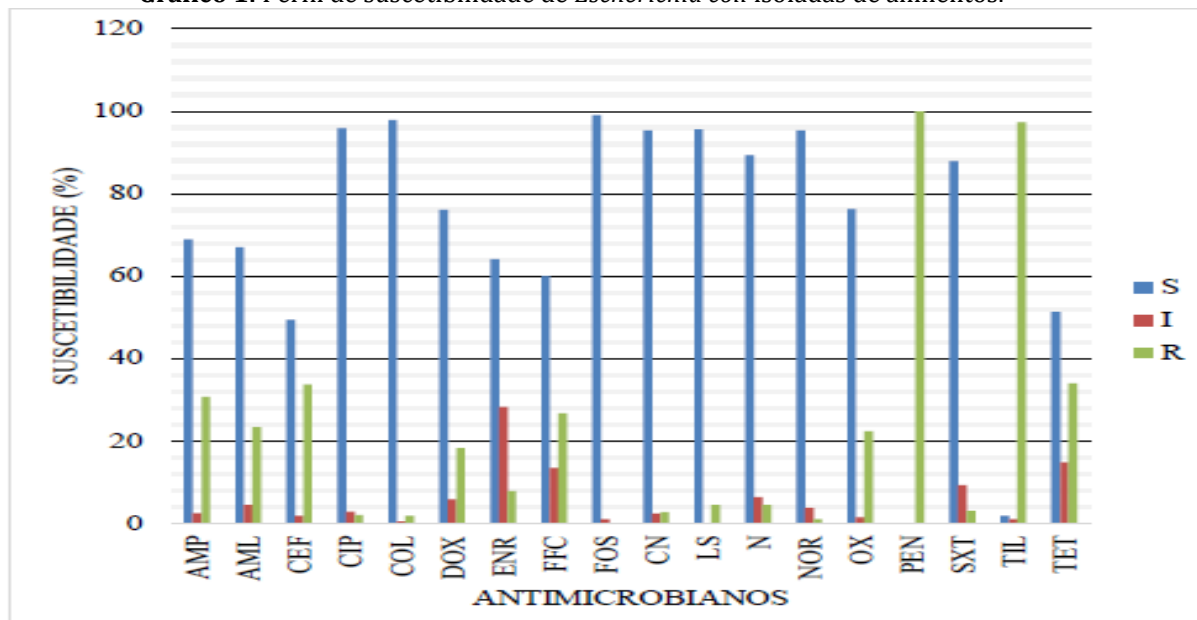
A presente pesquisa não obteve necessidade de aprovação do comitê de ética CEUA/Jataí, por se tratar de um levantamento em amostra presentes na bacterioteca da universidade federal de jataí.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Antibiograma

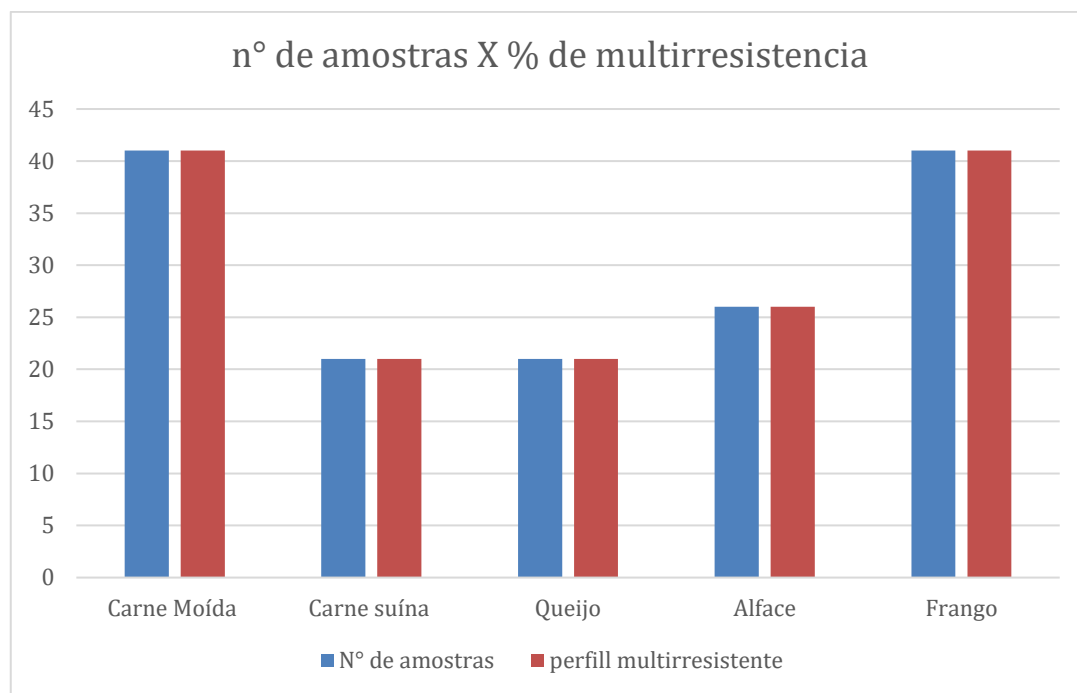
Foram testadas 18 drogas distintas, de grupos diferentes ou pertencentes ao mesmo grupo nas 150 amostras, onde foi possível observar alta taxa de resistência e multirresistência. Todas apresentaram resistência a pelo menos 2 antimicrobianos testados (gráfico 1), evidenciando 100% (150/150) de cepas multirresistentes (gráfico 2).

Gráfico 1: Perfil de suscetibilidade de *Escherichia coli* isoladas de alimentos.



Legenda: AMP – ampicilina, AML – Amoxilina, CEF – Ceftiofur, CIP – Ciprofloxacina, COL – Colistina, DOX – Doxiciclina, ENR – Enrofloxacin, FFC – Florfenicol, FOS – Fosfomicina, CN – Gentamicina, LS – Linco Spectrin, N – Neomicina, NOR – Norfloxacin, OX – Oxitetraciclina, PEN – Penicilina, SXT – Sulfa+Trimetopim, TIL – Tilmicosin, e TET – Tetraciclina, S – Sensível, I – Intermediária e R – Resistentes.

Gráfico 2: % de amostras Multirresistentes.



As amostras de *E. coli* testadas foram testadas quanto o seu perfil de susceptibilidade antimicrobiana e classificadas como resistentes ou multirresistentes, e o antimicrobiano com maior resistência foi a penicilina, cujo o mecanismo de ação sugere que o seu carácter bactericida deriva da sua intervenção como inibidor enzimático do processo de transpeptidação durante a sua síntese da membrana. Desta forma, a penicilina atua debilitando a parede bacteriana e favorecendo a lise osmótica da bactéria durante o processo de multiplicação. ALTERTHUM, 2015). A Penicilina acompanhada pelo Tilmicosina se mostrou com maior taxa de resistência, e esse fato pode ser atribuído ao uso indiscriminado dos antimicrobianos, em saúde humana como retrata a penicilina, como em saúde animal evidenciado devido os resultados de resistência do Tilmicosin.

Por outro lado, as drogas que apresentaram o maior perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foram a fosfomicina onde 100% dos isolados se mostraram sensível, seguido da colistina. O que é correto afirmar visto que a fosfomicina é um antimicrobiano de amplo espectro utilizado apenas em hospitais e para infecções bacterianas que apresentem uma alta resistência as outras drogas e a colistina apesar de ser um droga com atuação frente as bactérias gram-negativa e aeróbicos facultativos se mostra sensível devido a cautela em receitar o seu uso devido o seu potencial de toxicidade quando somado a outras drogas, ambas as drogas não são empregadas demasiadamente o que justifica o seu excelente resultado bactericida.

Nakamoto et al (2018) estudando *E-coli* em carne moída, também identificou um perfil de resistência a penicilina (33%). Enquanto que Queiroz (2017) constatou em seu estudo com produtos cárneos uma alta taxa de resistência a penicilina com 92,5%, frente a *Escherichia coli*. Franco et al. (2010) constataram em seu estudo com isolados de *E.coli* em carne suína, cepas que apresentaram 100% de resistência a penicilina. Cardoso et al. (2015) identificou cepas resistentes a Fosfomicina, Gentamicina e Norfloxacin. Enquanto nesse estudo a droga com maior perfil de sensibilidade foi a Fosfomicina. Para o antimicrobiano Colistina Corrêa (2013) encontrou em seu estudo com frango 96,7% de sensibilidade a colistina, dados esse que validam com o desse estudo. Enquanto que no estudo de Mantilla e Franco (2012) em amostras de carne bovina, foram identificada resistência a colistina, porém em pequenas porcentagens 0,88%.

4.2 Avaliação do efeito antimicrobiano do extrato de *Solanum palinacanthum* em isolados de *E. coli* por disco difusão e microdiluição.

Ao analisar a disco difusão, não foi possível determinar a potencial de ação bacteriostática ou bactericida pelo método de disco empregado, já que todas as diluições não se mostraram capazes de inibir o crescimento bacteriano, não apresentando halo de inibição em nenhuma das concentrações testadas.

O extrato etanólico das folhas de *Solanum palinacanthum* não teve atividade antimicrobiana sobre *Escherichia coli* na concentração de 10 mg/mL.

Alguns estudos também não verificaram a atividade antimicrobiana de plantas naturais. Santos (2019) evidenciou no seu estudo a inatividade dos compostos com efeitos inibitórios, frente às bactérias gram-negativas dentre as testadas a *E. coli*, mesmo que na máxima concentração (CIM maior que 5 mg/mL), justificando-se, pela constituição da parede bacteriana a qual atua como uma barreira. Santos et al (2018) testaram extrato etanólico do fruto verde e maduro de *Solanum lycocarpum*, sobre isolados de *E. coli* representando o grupo gram-negativo, com o CIM maior que 2000 µg/mL, porém não observaram resultado com potencial antibacteriano.

Souza et al (2010) realizaram um estudo com a popularmente conhecida pimenta biquinho, comercializada em Santa Helena de Goiás, pertencente à família Solanacea onde testou o extrato etanólico bruto obtido a partir dos frutos vermelhos de *C. chinense* que exibiu moderada atividade antibacteriana frente às bactérias *E. coli* nas Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 250 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente.

4.3 Avaliação do efeito antimicrobiano do extrato de *Siparuna guianenses* em isolados de *E. coli* por disco difusão e microdiluição

Ao analisar a disco difusão, não foi possível determinar a potencial de ação bacteriostática ou bactericida pelo método de disco empregado, já que todas as diluições não se mostraram capazes de inibir o crescimento bacteriano, não apresentando halo de inibição em nenhuma das concentrações do extrato (quadro 4).

O extrato etanólico das folhas de *Siparuna guianenses* não teve atividade antimicrobiana sobre *Escherichia coli* na concentração de 10 mg/mL.

Com relação aos testes de avaliação do potencial antibacteriano das espécies vegetais frente a bactéria *E. coli* (Magalhães, 2018) na utilização do extrato qual??? não evidenciou resultado que pudesse determinar o valor da CIM *Siparuna*, entretanto, observou que o extrato da negramina inibiu o crescimento bacteriano em 89,3% na maior concentração testada, quase alcançando o valor estabelecido pelo da CIM, além disso, também apresentou 67,9% de inibição na concentração de 2000 µg/mL.

Em estudos realizados utilizando o óleo essencial da negramina, foi possível avaliar atividade antibacteriana frente a *E. coli*, o autor Montanari 2010, evidenciou que o óleo, inibiu o crescimento bacteriano em concentrações relativamente baixas 863 µg. mL⁻¹. Da mesma forma em que Andrade (2013) notou atividade inibitória em concentrações baixas 125-500µg.mL⁻¹. Soares 2010, em Botucatu São Paulo, testou diversos extratos, dentre eles a *Siparuna*, entretanto, não evidenciou nenhum efeito inibitório ATCC 25922 (CLSI 2018), entretanto obteve resultados positivo para a cepas *Staphylococcus Aureus*.

Mignoni 2020 realizou as duas técnicas inibitórias (disco difusão e microdiluição) usando extratos, evidenciando em seu estudo uma maior inibição das bactérias Gram positivas, não obtendo inibição para *E. coli* e justifica esse resultado através de dois autores. O primeiro justifica essa ausência inibitória, através da constituição da parede bacteriana, onde as Gram negativas apresentarem uma membrana externa em torno da parede celular, dificultando assim a permeabilidade das amostras testadas (CHEW et al., 2011).

O segundo autor, levanta a importância do emprego de duas metodologias distintas, mas que ao final segue o mesmo objetivo, o que permitiu concluir que a técnica de microdiluição em caldo foi mais sensível em relação à difusão em disco, fato que provavelmente ocorreu devido à baixa solubilidade de produtos naturais no ágar e a dificuldade de difusão em disco de moléculas de alta polaridade e/ou maior massa molecular (Alves et al., 2008).

Os efeitos antimicrobianos das plantas já foram descritos em outros estudos. A utilização das plantas medicinais é uma das mais antigas armas empregadas para o tratamento de enfermidades humanas e muito da informação a respeito de seu uso vem através da sabedoria popular. Temos plantas já conhecidas, a Cancorosa-de-três-pontas *Jodina rhombifolia*, suas folhas e ramos em uso interno (infusão a 5%) são indicados nos resfriados e nos distúrbios do aparelho digestório.

As cepas de *E. coli* testadas neste estudo foram anteriormente confirmadas como resistentes ou multirresistentes, e o antimicrobiano com maior resistência foi a penicilina, cujo o mecanismo de ação sugere que o seu carácter bactericida deriva da sua intervenção como inibidor enzimático do processo de transpeptidação durante a sua síntese da membrana. Desta forma, a penicilina atua debilitando a parede bacteriana e favorecendo

a lise osmótica da bactéria durante o processo de multiplicação. Portanto o resultado negativo do efeito antimicrobiano dessas plantas nestes isolados pode sugerir que essas plantas também tenha uma ação frente a membrana de bactérias e estas por serem comprovadamente resistentes a antimicrobianos que atuam em membrana podem ter apresentado um efeito antimicrobiano negativo.

Outro ponto que pode explicar a ausência de inibição é a concentração dos compostos com atividades antimicrobiana que podem está em pequena quantidade nesses extratos, em decorrência do processo de extração do extrato bruto, uma vez que outros estudos identificam atividade nas mesmas plantas, porém com outras formas de extrações que é o caso do óleo essencial, onde outros estudos apontam a sua eficácia inibitória.

4.4 Caracterização molecular das *E. coli* isoladas de alimentos

4.4.1 Grupos filogenéticos

Após a determinação dos grupos filogenéticos (quadro 1), foi possível determinar que o grupo filogenético B1 obteve maior representatividade, correspondendo a 62% (94/150) do total das amostras analisadas, seguido dos pertencentes aos grupos filogenéticos A ou C, correspondendo a 27% (27/150) do total, o Clado I ou II com 3% (4/150) do total, grupo filogenético B2, sendo o menos frequente, apresentou 1% (1/150) do total, grupos filogenéticos D ou E, com 6% (9/150) do total, e o grupo filogenético, com 4% (6/150) do total. 6% (9/150) das amostras analisadas foram classificadas como grupo indeterminado (U). Em determinadas situações, a PCR quadruplex não determina amostras pertencentes aos grupos filogenéticos A ou C e D ou E, havendo a necessárias de outras PCRs, elas não foram realizadas no presente estudo (tabela 1 e figura 12).

Tabela 01: Distribuição dos grupos filogenéticos de *E. coli* isoladas de alimentos

Grupo Filogenético	Carne moída	Carne suína	Frango	Queijo	Alface	Total por Grupo	% por Grupo
A ou C	7	6	9	2	3	27	18%
B1	30	12	20	17	15	94	62%
B2	-	-	1	-	-	1	1%
Clado I ou II	-	2	-	2	-	4	3%
D ou E	2	-	1	-	6	9	6%
F	-	-	6	-	-	6	4%
U	2	1	4	-	2	9	6%
TOTAL	41	21	41	21	26	150	100%

Figura 12: Perfil eletroforético dos produtos da PCR quadruplex

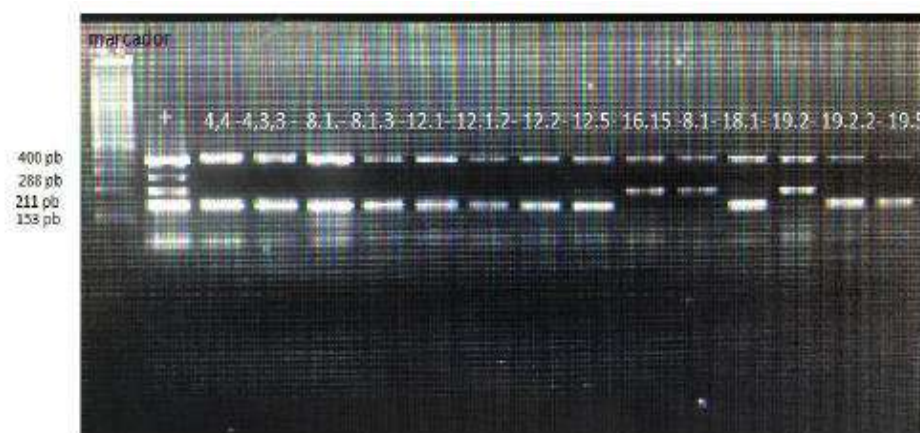


FIG 12: para a amplificação dos genes arpA (400 pb); chuA (288 pb); yjaA (288 pb) e do fragmento TspE4.C2 (153 pb), utilizados para a classificação dos grupos filogenéticos de *E. coli* isoladas de acordo com Clermont (2013). M = Marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder Plus; (+) = controle positivo; os números acima das canaletas correspondem à identificação das amostras de carne moída

Os grupos filogenéticos propostos por Clermont et al. (2013), se encontra todos presentes dentre os 150 isolados de *E. coli*, proveniente de matrizes alimentícias. GUIMARÃES et al (2015) demonstram que cepas isoladas de *E. coli* podem possuir múltiplas origens, possuindo ou não linhagem patogênica, sendo característico de possível aquisição horizontal de genes virulentos. Em função da variedade entre linhagens o conhecimento dos filos grupos predominantes em diversas regiões é de fundamental importância. Escobar-Páramo et al. (2006) traz em seu estudo que características específicas das populações comensais de *E. coli* de mamíferos e aves estão relacionadas ao ambiente *versus* hospedeiro. Todos os grupos filogenéticos foram 100% multirresistentes os antimicrobianos convencionais e aos extratos testados.

A classificação filogenética por PCR quadruplex descrita por Clermont foi efetiva para a determinação dos grupos filogenéticos dos isolados de *Escherichia coli* utilizados nesse estudo. Todos os grupos filogenéticos descritos por Clermont et al. (2013) foram detectados entre as amostras analisadas. O grupo B1 (comensal) foi o mais prevalente considerando o conjunto total de amostras analisadas. A maior prevalência para o filo grupo B1 nos diz que apesar dos alimentos terem a presença de *E. coli*, elas não possuem capacidade de virulência, sem grandes capacidades de causar danos à saúde. Uma única amostra foi classificada para o filo B2 de carne de frango, e 9 amostras identificadas pra o grupo D ou E sendo duas amostras de carne moída, uma de frango, e seis amostras de alface, que possuem capacidade de virulência.

Todas as cepas foram multirresistentes e os grupos patogênicos B2 e D ou E tiveram perfil de resistências as drogas amoxilinas, ampicilinas, penicilinas, doxiciclinas, oxitetraciclina, sulfa e trimetropin, gentamicina e neomicina.

É importante enfatizar que a bactéria para ser patogênica e resistente ela demanda de um grande gasto energético e que por muito tempo essa informação serviu de acalento aos cientistas e o presente estudo evidencia que apesar do pequeno número de *E. coli* patogênicas é resistente aos antimicrobianos, está presente no dia a dia do consumidor e que pode ser um indicador de possíveis problemas relevantes em saúde pública, caso medidas higiênicas, boas práticas de fabricação/manipulação e principalmente uso racional de antimicrobianos e promotores de crescimento não seja aplicados de maneira acertiva a fim de minimizar contaminação ou infecção causadas por *Escherichia coli*.

4.4.2 Caracterização molecular dos patótipos

Com relação a presença de patótipos STEC, EHEC ou EPEC nestas amostras estudadas, nenhum isolado apresentou o resultado positivo de amplificação para os genes de virulência *stx1*, *stx2* (Figura 13) e para *eaeA* (figura 14). Para que fossem classificados como EPEC obrigatoriamente as amostras deveriam apresentar o gene *eaeA*, para serem classificados como STEC expressar os genes *stx1*, *stx2* ou ambos, e para ser pertencente ao patótipo EHEC teria que expressar *stx1* ou *stx2* ou ambos e ainda o gene *eaeA*. Sendo assim, conforme o Quadro 03, nenhum dos patótipos (STEC, EPEC e EHEC) foi identificado entre os *pools* testados, representando os 150 isolados de *E. coli*.

Figura 13: Eletroforese em gel de agarose para visualização dos genes *stx1*, *stx2* e E16s

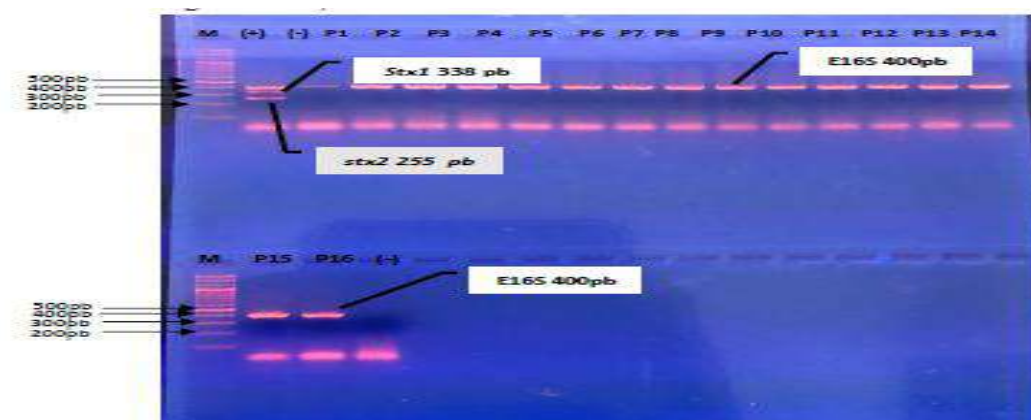


FIG 13: Eletroforese para visualização dos produtos de amplificação dos *stx1* 338pb, *stx2* 255pb e E16s 400pb. M = padrão de peso molecular 100bp ladder plus; (+) = controle positivo para *stx1* e *stx2* (amostra 175 de ovinos), (-) para *stx1* e *stx2* (com uma bactéria que não é *stx1* e *stx2*), P1 a P16 = *Pools* de amostras de *E. coli* isoladas de alimentos. P1 a P14 = carne moída; P15 e P16 = carne de frango; (-) = controle negativo (com água ultrapura).

O gene para o rRNA 16S (E16S) tiveram amplificação em todos os *pools E. coli* utilizados nesse estudo (Figura 13), confirmando a presença, a qualidade física e a pureza do DNA. Extinguindo as possibilidades de contaminação nas amostras dos alimentos testados (carne moída, frango, suína, queijo tipo minas frescal e alface).

Figura 14: Eletroforese em gel de agarose para visualização do gene *eaeA*



FIG 14: Eletroforese para visualização dos produtos de amplificação do gene *eaeA* 248pb. M = padrão de peso molecular 100bp ladder plus; (+) = controle positivo para *eaeA* (amostras O157.H7), P1 a 31 = *Pools* de amostras de *E. coli* isoladas de alimentos. P1 a P14 = carne moída; P15 a P22 = carne de frango; P23 a P26= carne suína, P27 a P29 = queijo minas frescal, P30 e P31= alface; (-) = controle negativo (com água ultra pura)

Xia et al., (2010), nos Estados Unidos da América (EUA) evidenciaram em carne moída, frango e porco a prevalência de 0% na pesquisa de STEC na carne de frango e, determinou a prevalência de 0,09% (1/1.167) de STEC em carne suína ambos resultados compactua com os nossos resultados, pois não identificamos a presença de STEC em carne suína e de frango.

Já, Alonso et al., (2012), na Argentina pesquisaram prevalência de STEC em hamburgueres, miúdos, carcaças e cloacas frango, revelando ter encontrado uma prevalência geral de 5% (53/1.057) de STEC em amostras de alimento de frango, contradizendo nossos dados ainda em sua pesquisa, quando direcionada a carne de frango não foi identificado a prevalências de EHEC, o que concorda com nosso estudo que também não evidenciou amostras positivas.

Franco et al., (2008), em uma pesquisa no Rio de Janeiro, o qual pesquisavam *Escherichia coli* em várias partes da carne suína, revelaram não ter encontrado nenhuma cepa de EHEC em carne suína, o que entra em concordância com nosso estudo que também não encontrou EHEC em carne suína.

Outros autores como Timm et al., (2009), no Sul do Brasil, pesquisando EPEC em amostras de carne moída e leite cru, encontraram 2% de prevalência de EPEC, o que difere de nossos resultados. Hill et al. (2011), encontraram resultados positivos para *Escherichia coli* diarreiogênicas encontradas em alimentos crus ou mal cozidos (carne moída, carne de frango) 4,6% de EPEC diferindo mais uma vez desse estudo.

Wang et al, (2017) no Japão, evidenciaram 18% (5/28) de EPEC *E. coli* diarreiogênicas isoladas em carne suína, mais um dado em desacordo com o presente estudo. González et al. (2017), na Argentina, evidenciaram em seu estudo com *E. coli* diarreiogênicas isoladas de vegetais, 1,1% (3/267) de amostras positivas para EHEC, diferindo do estudo atual.

Não foram encontrados os patótipos EHEC, STEC e EPEC nas amostras de alimentos analisadas neste estudo. No entanto, a presença de *Escherichia coli*, uma bactéria comensal do intestino, que quando encontrada em alimentos para consumo humano indica contaminação fecal, o que pode estar envolvido neste processo a falta de higienização na manipulação e preparo destes alimentos no varejo ou no processamento na indústria.

Há ausência de cepas diarreiogênicas positivas, sugere menores probabilidades de surtos com DVA na região advinda a amostragem, porém esse elevado índice de contaminação por *E. coli* reflete o risco de serem encontrados nos alimentos *E. coli* diarreiogênicas que podem levar a problemas mais graves em grupos de risco, afetando principalmente crianças, idosos e imunocomprometidos, desde uma diarreia simples a colites hemorrágicas e Síndrome Hemolítica Urêmica nos quais podem ser fatais.

Entretanto, acreditamos que não obtivemos resultados positivos, para o grupo diarreio gênicas devido o N amostral, quando comparado as demais literaturas. As *E. coli* pesquisadas não eram diarreio gênicas para nenhum desses três patótipos STEC, EHEC e EPEC, não excluindo a possibilidade de pertencer a outros patótipos ou até mesmo a esses três já pesquisados, caso aumente o número amostral ou até mesmo de ser extra intestinais que também são importantes em saúde pública.

5 CONCLUSÕES

A *Siparuna guianensis* e a *Solanum palinacanthum* de acordo com a metodologia aplicada e as concentrações testadas, não apresentaram efeito antimicrobiano nas cepas de *E. coli* nessa pesquisa. Ainda são poucos os estudos sobre o potencial para fitoterápicos e fármacos e, no campo da agroecologia para *S. guianensis* e *S. palinacanthum*. A ação antimicrobiana dessas plantas se dá pela presença de metabólitos secundários, e foi comprovada a eficiência antimicrobiana destas plantas em algumas pesquisas, porém os resultados obtidos no presente estudo não alcançou os mesmo que apresentaram uma resposta positiva em relação à ação contra as bactérias. Desta forma, o resultado da pesquisa testou negativo para a ação medicinal contra essas bactérias as quais foram submetidas em teste com as plantas *S. guianensis* e *S. palinacanthum*.

Todos os filogrupos tiveram exemplares identificados nesse estudo e a grande maioria se tratando de *E. coli* comensal, mas foi indetificada 10 amostras com pertencentes aos grupos patogênicos, dessas amostras não foram identificadas como pertencentes aos patotipos EHEC, EPEC e STC, o que nós dizemos que o N amostral deve ser maior quando se tratando desses isolados em alimentos e que não exclui a possibilidade se pertencer a outros patotipos ou as extras intestinais.

Diante do exposto podemos concluir que são necessárias mais pesquisas para avaliação do efeito antimicrobiano da *S. guianensis* e *S. palinacanthum* em bactérias que sejam resistentes a outros antimicrobianos que não a penicilina ou beta-lactâmicos e que outros métodos de extrações devem ser investigados, visto a eficácia apresentada na literatura.

REFERÊNCIAS

- Albert MJ, Faruque SM, Faruque AS, Neogi PK, Ansaruzzaman M, bhuiyan, et al. 1995 Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. J Clin Microbiol. Apr;33(4):973-7.
- Albert MJ. 1996 Epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection in Bangladesh. Rev Microbiol. 27(1):17-20.
- Alice et al. 1995. Plantas medicinais de uso popular: Atlas farmacognóstico. Canoas: ULBRA. 205p.
- Alves EG. 2008 Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. Química Nova, v. 31, n. 5, p. 1224 - 1229.
- Andrade MA. 2011 Óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke e *Siparuna guianensis* Aublet: composição química, caracterização das estruturas secretoras e avaliação do potencial biológico. 2013. 227p. Tese (Área de concentração: Agroquímica) – Curso de Pós Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.
- CHEW, Y. L et al. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. BMC Complementary and Alternative medicine, v. 11, n. 12.
- Angeles GR. 2002 Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Publica Mex. sep;44(5):464-75.
- Arrais RB. 2020 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (stec) and *salmonella* spp. In Lettuce - Research, Society and Development.
- Azevedo, S. M. 2014. Farmacologia dos Antibióticos Beta-lactâmicos. 70f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa, Portugal.
- Babosa SF, et al. 2020 Qualidade Microbiológica de Frango Temperado Utilizadas Como Indicadores de Presença de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. – Research, Society and Development. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i11.10013>.
- Barbosa CN, et al. 2019 Gonzales AJ, Zulfo MA. Ciências Agrárias. Campo promissor em pesquisa 3. Cap 11 pagina 96 - Isolamento de *Staphylococcus aureus* em amostras de queijo.
- Barbosa CN. 2020 Qualidade microbiológica de lombo suíno e correlação entre microrganismos indicadores. Brazilian Journal of Development DOI:10.34117/bjdv6n5-058.

- Basu D, li XP, Kahn JN, Maio KL, Kahn PC, Tumer NE. 2015 The A1 subunit of Shiga toxin 2 has higher affinity for ribosomes and higher catalytic activity than the A1 subunit Shiga toxin 1. *J Microbiol Biotechnol.* v. 20 (1), p. 5-14.
- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Jawetz, Melnick, Adelberg: 2009 *Microbiologia Médica*. 24 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 820p.
- Canizale R.A, Gonzalez N.E, Vidal J.E, Flores V.H. 2013 Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. *Int J Food Microbiol.* Jun;164(1):36-45.
- Coradin, Siminski, Reis, 2011- *Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial - Plantas para o Futuro - Região Sul*. 1ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2011, v. 1, p. 13-934.
- Croxen MA, Finlay BB. 2010 Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, p. 26-38.
- Dastmalchi K, Wang I, Stark RE. 2016 Potato wound-healing tissues: A rich source of natural antioxidant molecules with potential for food preservation, *Food Chemistry* v.210, p.473-480.
- Donnenberg MS, Whittam T. S. 2001 Patogênese e evolução da virulência em *Escherichia coli* enteropatogênica e enterohemorrágica. *The Journal of clinical investigation* v. 107, n. 5, p. 539-548.
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). 2016 The European Union report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. *EFSA Journal*, v. 14, n. 2, p. 01-207.
- Fagundes NU, Scaletsky ICA. 2000 The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. *São Paulo Med J*;118(1):21-9.
- Falkenberg, Simões. 2011 Introdução à Análise Fitoquímica. In: Simões C.M.O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre (RS) e Florianópolis (SC): Ed. UFRG/ UFSC, p.228 – 45.
- Faula LL, et al Cerqueira MO, Magalhaes PR. 2017 Antimicrobial susceptibility profile and identification of pathotypes diarrheagenic between *Escherichia coli* strains isolated from food bras. *Ci. Vet.*, v. 24, n. 1, p. 108-115, abr./jun.
- Gomi R, Matsuda T, Fujimori Y, Harada H, MATSUI Y, YONEDA H. 2015 Characterization of Pathogenic *Escherichia coli* in River Water by Simultaneous Detection and Sequencing of 14 Virulence Genes. *Environ Sci Technol.* v. 49 (11), p. 6800-6807.
- Guimaraes DO, Momesso LS & Pupo MT. 2010. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, 33(3): 667-679
- H. 2006 Caracterização dos isolados de *Escherichia coli* positivo para o gene da toxina Shiga (*stx*) e positivo para o gene da intimina (*eae*) de águas residuais de matadouros na França. *Applied and Environmental Microbiology*. 72, n. 5, p. 3245-3251, 2006.
- Hacker, Miles S, Messer II, William A. Bachmann, Kenneth. 2009 *Pharmacology: Principles and Practice*. Academic Press, pp. 380.
- Haida KS Parzianello L, Werner S, Garcia DR, Inácio CV. 2007 Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 11(3):185- 192.
- Kindlein L, Lassen P, Ferreira T.Z. 2014 *Inspeção e Tecnologia de Produtos de Origem Animal com Enfoque em Concursos Públicos*, Apostila, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 101p. 2014.
- Konowalchuk J, Speirs J.L, Starvic S. 1977 Vero response-to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, Washington, v. 18, n. 3, p. 775-779, Dec.
- Kyung-hwan OH, Soo-bok KIM, Sun PARK, Seung-hak CHO. 2014 Development of a one-Step PCR Assay with Nine Primer Pairs for the Detection of Five Diarrheagenic *Escherichia coli* Types. *Journal Microbiology Biotechnology*, v.24, n.6, p.862-868.
- Lammie SL, Hughes JM. 2016 Antimicrobial resistance, food safety, and one health: the need for convergence. *Annual review Food Science and Technology*, v.7, p.287-312.
- Lim JY, Yoon JW, Hovde C. J. 2010 Involvement of the *Escherichia coli* O157:H7(pO157) effect operon and lipid A myristoyl transferase activity in bacterial survival in the bovine gastrointestinal tract and bacterial persistence in farm water troughs. *Infect Immun.* v. 73(4), p. 2367-2378.
- Loh KY, Sivalingam N. infecções do trato urinário na gravidez. 2015 *Médico Malaysian Fam.* 2017; 2: 54-7.
- Lo Y., Zhang L., Foxman B., Zöllner S. O sequenciamento do genoma completo de *Escherichia coli* uropatogênica revela uma longa história evolutiva de diversidade e virulência. *Infectar. Genet. Evol.* 34 244-250. 10.1016 / j. meegid.2015.06.023
- Lopes ACC, Pinto HRF, Costa DCIO, Mascarenhas RJ, Aquino JS. 2014 Avaliação das Boas Práticas em unidades de alimentação e nutrição de escolas públicas do município de Bayeux, PB, Brasil, RESUMO, Universidade Federal da Paraíba, 2014.
- Lorenzi, Matos. 2002. F.J.A. *Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas*. 1. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2002, p.512.
- Loukiadis E, Kourourdan M, Beutin L, Oswald E, Brugre M. 2018 -Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de *Oenocarpus bacaba* Mart., *Cordia glabrata* Mart. e *Siparuna guianensis* Aubl. 2018. [37f]. Trabalho de Curso de Farmácia – Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Sinop.

- Matias L J et al. 2016 Structure and histochemistry of medicinal species of Solanum. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 26, n. 2, p. 147-160.
- Mignoni C.I Homem. 2015 Estudos Fitoquímicos, Ensaios de Toxicidade, Atividade Larvicida, Antimicrobiana e Antioxidante das Folhas e Caules de Mollinedia Clavigera tul. (monimiaceae)- Universidade Federal do Paraná- Curitiba.
- Mohammed MA, Sallam KI, Eldaly EAZ, Ahdy AM, Tamura T. 2014 Occurrence, serotypes and virulence genes of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fresh beef, ground beef, and beef burger. Food control, v. 37, p. 182-187.
- Montanari RM. 2010 Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais de espécies de Anacardiácea, Simarunácea e Verbanaceae. Tese, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, dezembro.
- Muhs A, Lyles J, Parlet C. et al. 2017 Inibidores de virulência do sensor de quorum do bloco de árvore de pimenta brasileira e redução da dermonecrose em modelos de infecção de pele. Sci Rep, v. 7.
- Murray P.R, Rosenthal K.S, Kobayashi G.S, Pfaller M.A. 2014 Microbiologia Médica. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier 888p.
- Nardeli JV, Carvalho CT, Arruda EJ, Nova PV, Oliveira LS, Arakaki AH. 2014. Síntese, Caracterização e Atividade Biológica do Acetato de Cu (II) para Larvas de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) e Bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes*.
- Nguyen Y, Sperandio V. 2012 Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 2, p.1-7.
- Ochoa TJ, Contreras CA. 2011 Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. Curr Opin Infect Dis. Oct;24(5):478-3.
- Panò, Stefania. 2016 Mechanisms of Salmonella Typhi Host Restriction. Biophysics Of Infection, [s.l.], p.283-294, q6q22
- Paton JC, Paton AW. 1998 Patogênese e diagnóstico de infecções por *Escherichia coli* produtoras de toxinas Shiga. Clinical Microbiology Reviews, v. 11, n. 3, p. 450-479.
- Petrosyan M, Shcherbakova Y, Sahakyan N, Vardanyan Z, Poladyan A, Popov Y. 2015 *Alkanna orientalis* (L.) Boiss. Culturas isoladas de plantas e atividade antimicrobiana de seus extratos: fenômeno, dependência de diferentes fatores e efeitos em algumas propriedades bacterianas associadas à membrana. Cultivo ao órgão de tecidos de células vegetais, v.122, p.727-38.
- Polito M, Kirzajn GM. 2010 Microangiopatias trombóticas: púrpura trombocitopênica trombótica e síndrome hemolítico-urêmica. Brazilian Journal of Nephrology, v. 32, p. 303- 315.
- Rajeh MAB, Zuraini ZSA, Sidharan S, Latha LY, Amutha S. 2014 Avaliação de extratos de folha, flor, caule e raiz de *Euphorbia hirta* L. Quanto à atividade antibacteriana e antifúngica e letalidade de camarão em UPADHYAY, A.; UPADHYAYA, I.; KOLLANOOR-JOHNY, A.; VENKITANARAYANAN, K. Combate a microorganismos patogênicos usando antimicrobianos derivados de plantas: uma revisão minuciosa da base mecanicista. Biomed Res Int., v.18.
- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. 1983 Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. New England Journal of Medicine, Waltham, v. 308, n. 12, p. 681-685, Mar.
- Ronald AR, Nicolle LE, Stamm E, Krieger J, Warren J, Schaeffer A, et al. 2001 Infecção do trato urinário em adultos: prioridades e estratégias de pesquisa. Int J Antimicrob Agents. 17 (4): 343-8.
- Saad SMI. 2006 Probióticos e prebióticos: o estado da arte. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 42, n. 1, p. 1-16.
- Santo MG. – 2019 Avaliação da Atividade Antibacteriana do efeito Mutagenico do Extrato e Frações Obtidas das Partes Aéreas de Solanum capsicoides (SOLANACEAE) -Universidade do Vale Do Itajaí SC- Itajaí.
- Santos AC, AT AL; Amaro HS, Lima SK, Avelar PA, SILVA NL. 2018 Evaluation of the Antibacterial Activity of Green and ripe Fruits of Solanum Lycocarpum – E-Scientia.
- Silva MM, Lidon FC. 2016 Food preservatives – An overview on applications and side effects. Emirates journal of food and agriculture, 28(6), 366 – 373.
- Soares SG. 2010 Atividade antibacteriana de plantas da região de Botucatu/ Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho - São Paulo.
- Souza SL, Fernandes CC, Miranda LD. 2010 Extrato etanólico dos frutos de capsicum chinense e sua ação contra *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*: um breve relato: Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Volume 1.
- Torres AG, Zhou X, Kaper JB. 2005 Adherence of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains to Epithelial Cells. Infection and Immunity. v. 73, n. 1.
- Tozzoli R, Grande L, Michelacci V, Fioravanti R, Gally D, Ragione R, Anjum M, Wu G, Caprioli A, Morabito S. 2014 Identification and characterization of a peculiar vtx2-converting phage frequently present in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 isolated from human infections. Infection and Immunity, v. 82, n. 7, p. 3023-3032.

Vendruscolo et al. 2005 Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Revista Brasileira de Farmacognosia [online], v. 15, n. 4 pp. 361-372.

WHO. 1984 World Health Organization. The role of food safety in health and development. Expert Committee on Food Safety. Report of Joint FAO/WHO. Genebra. 79 p.

Wiles T.H, Kulesus R.R, Mulvey M.A. 2008 Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. Experimental and Molecular Pathology, v. 85, p. 11-19.

Anexos

1. Organize o artigo em **TÍTULO, RESUMO, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÃO(S)** (os três últimos preferencialmente em capítulos separados), Agradecimentos, Declaração de conflito de interesse e **REFERÊNCIAS**:

- a. O **TÍTULO** deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; informar detalhes de identificação científica nos **MATERIAIS E MÉTODOS**.
 - b. Nomes de **autores com vários nomes e sobrenomes devem ser abreviados**, por exemplo, simplificar Claudio Severo Lombardo de Barros para Claudio SL Barros ou Barros CSL.
O Autor para Correspondência deve ser aquele que garante o contato com o Corpo Editorial do PVB. Eleve mais uma vez os asteriscos para a chamada às notas de rodapé, para que pareçam maiores.
 - c. O **Título do RESUMO** deve conter os nomes abreviados e invertidos dos autores, o ano, o título [a travar quando traduzido] e o endereço postal do laboratório ou instituição onde foi realizada a parte principal da pesquisa (compare sempre os autores do artigo e sua listagem no Título do Resumo para evitar discrepâncias).
 - d. A **nota de rodapé da primeira página** deve conter o endereço profissional completo de cada Autor (no idioma do país do Autor onde a correspondência pode ser enviada, português, espanhol, inglês, etc.), bem como o e-mail sublinhado do correspondente Autor.
 - e. O **RESUMO** deve ser uma versão bem explicada do **RESUMO** em português, seguido de "TERMOS DO ÍNDICE", que deve incluir os termos do título, visto que não são apenas Termos Adicionais do Índice.
 - f. O **RESUMO** deve conter (1) o título [entre colchetes e em negrito] (2) o que foi investigado, indicando (2) os materiais e métodos utilizados, (3) os resultados mais importantes e (4) a conclusão, seguida por "TERMOS DE INDEXAÇÃO" (que também incluem palavras do título, pois não são apenas Termos Adicionais do Índice).
 - g. A **INTRODUÇÃO** deve ser curta, com citação da literatura específica, seguida do objetivo da pesquisa.
 - h. Em **MATERIAIS E MÉTODOS**, forneça todos os dados necessários para repetir o estudo.
 - i. Em **RESULTADOS** são apresentados os dados obtidos de forma concisa.
 - j. Em **DISCUSSÃO**, confronte os resultados com a literatura. Evite mencionar o desenvolvimento de pesquisas ou planejamentos futuros para evitar o compromisso da revista em publicar os resultados.
 - k. Basear as **CONCLUSÕES** apenas em seus resultados.
 - l. Não mencione **Agradecimentos** no texto ou nas notas de rodapé, mas após as **CONCLUSÕES**.
 - m. Declare qualquer **conflito de interesses** ou "**nenhum**" se for o caso.
 - n. As **REFERÊNCIAS** devem incluir todas as citações consultadas e apresentadas cronologicamente no texto. Escreva a lista de **Referências** em ordem alfabética e cronológica, começando pelo sobrenome do primeiro autor, seguido de todos os demais autores da respectiva referência, em letras maiúsculas e minúsculas. Cada Autor dividido apenas por uma vírgula, seguido do ano, título, e os dados da publicação (extensivamente em caso de dúvida sobre abreviatura), de acordo com www.pvb.com.br.
2. O **estilo da revista deve ser atendido**, da seguinte forma:
- a. Font **Cambria em pitch 10, espaço simples entre linhas; formato de página A4, com margens de 2cm** (superior, inferior, esquerda e direita), texto justificado em

uma coluna. Coloque as legendas das Figuras abaixo da lista da Lista de Referência; não repita as legendas junto com as imagens das Figuras. Envie figuras e tabelas separadamente.

- b. **RESUMO** e **RESUMO** são escritos em apenas um parágrafo e não deve conter referências.
 - c. Os artigos devem ser concisos, sempre que possível no pretérito e impessoais.
 - d. Os nomes científicos devem ser apresentados por extenso (p.ex. *Palicourea marcgravii*) no início de cada capítulo (Título, Resumo, Introdução, etc.) quando aparecem pela primeira vez, seguidos da abreviatura do gênero (p. ex. *P. marcgravii*).
 - e. Nos títulos das tabelas e legendas das figuras, escreva os nomes científicos por extenso.
 - f. No texto, as chamadas às notas de rodapé são feitas em algarismos arábicos, em ordem crescente ao longo de todo o trabalho, sem a utilização de "Inserir nota final" de Word. Nota: Não use espaços entre os números e suas unidades para evitar separá-los em duas linhas (p. ex.: 100ppm, 10mm, 50cm, 18x10cm, $P < 0,05$). A abreviatura do número é "n °" e não "n o"; para graus Celsius "o C" e não "o C".
 - g. Tabelas e Figuras devem ser citadas no texto com seus respectivos números em ordem crescente.
 - h. Abreviaturas de instituições, quando apresentadas pela primeira vez, devem ser colocadas entre parênteses após o nome completo da instituição.
 - i. As citações da literatura no texto são feitas por "autor e ano" (p.ex. Caldas 2005). Cite artigos com dois autores usando os dois nomes (p.ex. Pedroso & Pimentel 2013.) Cite artigos com mais de dois autores no texto pelo primeiro nome do autor seguido de "et al." e o ano (p.ex. Brito et al. 2015). Se a citação de dois artigos for idêntica, faça a distinção acrescentando letras minúsculas após o ano de publicação (p.ex. Barros 2017a, 2017b). A ordem de citação no texto deve ser cronológica (p.ex. Barbosa et al. 2003, Armien et al. 2004).
 - j. **Consulte o texto completo de todos os artigos citados**; se não for possível, cite a referência original no texto do manuscrito como, p.ex., Bancroft (1921); e então, na Lista de Referências, deve aparecer como Bancroft 1921. título. ... Diário ... (Apud Suvarna & Layton 2013). Além disso, inclua esta referência consultada na íntegra na Lista de Referências.
 - k. O uso de "comunicação pessoal" e "dados não publicados" deve ser excepcional e citado no texto como Autor e Ano (Barbosa 2016), e na Lista de Referências como p.ex. Barbosa 2016. Comunicação Pessoal (Universidade Federal do Pará, campus Castanhal, Brasil).
 - l. **As legendas das figuras** (p.ex. "Fig.3.") devem ser suficientemente informativas para a compreensão (porque as Figuras são independentes do texto).
 - m. **Os títulos das tabelas** devem ser escritos em **negrito**, e o **cabeçalho** (títulos das colunas) deve ser claro (não negrito), escrito em letras maiúsculas e minúsculas, e separados por duas linhas horizontais longas. Não há linhas verticais nem fundo cinza; excepcionalmente podem existir linhas horizontais. As chamadas de notas de rodapé devem ser em letras minúsculas ou outros sinais, mas não em algarismos arábicos. As tabelas devem ser submetidas em Word (não como imagens) para permitir correções de acordo com o estilo da revista.
 - n. Os dados complexos devem ser **enviados** como **gráficos (mas referidos como Figuras)** em 2D sem fundo cinza e linhas horizontais. Escreva gráficos, incluindo texto, com Cambria em tom 10.
3. **Apresentação da figura:**
- a. Formato e dimensão: As imagens devem estar em formato TIF, canal RGB, 85 mm de comprimento e resolução de 300 dpi (pixel / polegada) para figuras coloridas e 600 dpi (pixel / polegada) para figuras em preto e branco (gráficos e mapas).

- b. Numeração: As figuras devem ser nomeadas separadamente e identificadas apenas por números na ordem em que são citadas no texto (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, etc.). Não use letras (Fig. 1A, 1B, 1C, etc.) para identificar as figuras.
 - c. Identificação de estruturas: Caso seja necessário destacar estruturas específicas dentro da imagem, utilize fonte "Cambria 8 pontos", preto ou branco, ou setas pretas ou brancas dependendo do fundo da figura.
 - d. Micrografias: as barras de escala não são obrigatórias.
 - e. Legendas das figuras: Cada figura deve ter uma legenda autoexplicativa. Deve conter o que está na imagem, seguido de informações adicionais (Exemplo de formato de legenda da figura: Fig.1. Descrição da imagem. Diagnóstico, órgão ou tecido, espécie animal, número do caso. Histoquímica (HE, PAS, etc.) ou método imunohistoquímico (vimentina, etc.). Ao descrever aspectos da imunohistoquímica, use o termo "imunomarcacão" em vez de "coloração" ou "positivo". Indique onde ocorreu a "imunomarcacão" (nuclear, citoplasmática e membranosa) e em que extensão. As legendas das figuras devem aparecer no manuscrito principal, após as referências.
4. **Todas as referências citadas no texto devem ser incluídas na Lista de Referências.** Antes de enviar o artigo, as discrepâncias devem ser corrigidas pelo Autor. O sistema ScholarOne bloqueia automaticamente se tais disparidades existirem).